



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA**  
**SCUOLA DI AGRARIA E MEDICINA VETERINARIA**

**Dipartimento di Medicina Animale,  
Produzioni e Salute**

**Corso di Laurea magistrale a ciclo unico in  
Medicina Veterinaria**

**TESI DI LAUREA**

***Profili fenotipici e genotipici di antibiotico-  
resistenza di ceppi di Salmonella spp.  
isolati da popolazioni canine in Italia***

**Relatore:** Prof.ssa Daniela Pasotto  
**Correlatore:** Dott.ssa Giorgia Dotto

**Laureanda:** Valeria Inglese  
Matricola n. 619444/MV

ANNO ACCADEMICO 2013 - 2014



## INDICE

	<i>pag.</i>
• Riassunto	1
• Abstract	2
• Introduzione	4
• Salmonellosi e antibiotico-resistenza: due priorità in sanità pubblica	5
1. La rilevanza delle Salmonellosi	5
1.1 L'attività di sorveglianza in Europa	7
1.2 Il caso italiano: la collaborazione tra ENTER-NET ed Enter-Vet	10
1.3 Gli isolamenti di <i>Salmonella</i> spp. da fonti umane e non umane	13
• L'antibiotico-resistenza	17
2. La chemioterapia antibiotica: dalle origini alla resistenza	17
2.1 Il monitoraggio del fenomeno	20
3. L'antibiotico-resistenza in <i>Salmonella</i> spp.	24
4. Il caso dei chinoloni	27
• Il cane come serbatoio per la Salmonellosi umana	29
5. Il rapporto cane – uomo: rischi e benefici	29
6. Il ruolo del cane nella trasmissione di <i>Salmonella</i> spp.	31
• <i>Salmonella</i> spp.	34
7. Il genere <i>Salmonella</i>	34
8. Habitat e diffusione	36
9. Caratteristiche fenotipiche	38
9.1 La struttura antigenica	40
10. Classificazione	42
11. La genetica del microrganismo: i plasmidi, un genoma extra-cellulare	43
11.1 I plasmidi R	45

• La Salmonellosi nel cane	46
12. La Salmonellosi nel cane: patogenesi, sintomatologia e terapia	46
• La Salmonellosi nell'uomo	48
13. Le modalità di trasmissione	48
14. La sintomatologia	50
• Scopo del lavoro	52
• Materiali e metodi	53
15. Il campionamento	53
16. L'isolamento e l'identificazione di <i>Salmonella</i>	54
17. La tipizzazione	60
18. I test di sensibilità in vitro: la metodica di Kirby-Bauer	61
19. Indagini biomolecolari	63
19.1 Amplificazione dei geni <i>gyrA</i> , <i>gyrB</i> , <i>parC</i> , <i>parE</i>	63
19.2 Ricerca dei geni PMQR - <i>plasmid mediated quinolone resistance</i> -	65
• Risultati e discussione	67
• Profili fenotipici di antibiotico-resistenza	75
• Profili genotipici di antibiotico-resistenza	87
• Conclusioni	89
• Bibliografia	i
• Ringraziamenti	

## Riassunto

Le malattie gastroenteriche, di cui la Salmonellosi fa parte, sono tra le prime dieci cause di morte al mondo, secondo le più recenti stime dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS).

Tale dato è aggravato spesso anche dalla concomitante presenza del fenomeno dell'antibiotico-resistenza: la mancanza di trattamenti efficaci, per alcune malattie come quella oggetto di questo studio, trovano nei casi più gravi, esito fatale.

In questo lavoro di tesi si è indagato sulla presenza di *Salmonella* spp. nel cane, animale che comunemente vive a stretto contatto con l'uomo, e sulle caratteristiche di antibiotico-resistenza dei ceppi isolati.

Nel presente studio sono stati analizzati campioni fecali provenienti da diverse popolazioni canine del Centro-Nord Italia. La prevalenza di *Salmonella* spp. riscontrata nella popolazione oggetto della nostra indagine è risultata pari a 2.75 %. Il sierotipo più frequentemente isolato è stato S. Napoli. Per quanto concerne il *panel* di antimicrobici testati, le resistenze più elevate sono state registrate nei confronti degli aminoglicosidi e dei trisulfamidici. Degna di segnalazione è stata anche la resistenza all'enrofloxacin, principio attivo appartenente ad una classe terapeutica molto usata in umana. L'analisi del profilo genotipico di resistenza, con particolare riferimento al ceppo resistente ai chinoloni, ha rilevato la presenza di una mutazione nel gene *gyrA*.

Lo studio da noi condotto ha evidenziato l'importanza del cane quale *reservoir* di batteri potenzialmente patogeni antibiotico-resistenti, come *Salmonella* spp. . Nella lotta a questo problema emergente per la sanità pubblica, i mezzi da mettere in campo sono rappresentati da una continua ricerca e un costante monitoraggio, volti a definire strategie adeguate per il suo contenimento e controllo.

## Abstract

According to World Health Organization, gastroenteric diseases, such as Salmonellosis, are one of the main causes of death for humans in the world, especially if associated to antimicrobial-resistant bacteria.

The aim of this thesis was to define the prevalence of *Salmonella* spp. of canine origin and the antimicrobial-resistance profiles of these bacteria. In order to analyse these features, we collected fecal samples from different canine populations in Italy. The prevalence of *Salmonella* spp. found in this study was 2.75%. *S. Napoli* was the most frequent serovar isolated. Aminoglycosides and triple sulfonamides were the most ineffective antimicrobials among the compounds tested. Different isolates showed resistance also to Quinolones, critically important antimicrobials in human medicine. The genotypic profiles of these strains highlighted the presence of chromosomal point-mutations in Quinolone Resistance Determining Regions (QRDRs), especially in *gyrA* gene.

This study underlines the important role of dogs as reservoir of antimicrobial-resistant *Salmonella* spp. and, in my opinion, it's important to define adequate strategies and studies in order to limit the diffusion of antimicrobial resistance as an emerging phenomenon and its high impact on public health.

## Introduzione

Nell'ambito delle scienze mediche, un tema di cruciale importanza è quello dell'antibiotico-resistenza: lo studio di questo fenomeno sta tenendo impegnato l'intero mondo scientifico sin dalla sua prima evidenza, nella seconda metà del Novecento.

I microrganismi sono stati le prime forme di vita a comparire sulla Terra, grazie all'interazione tra i composti presenti nel "brodo primordiale"; la loro esistenza rimase sconosciuta fino all'invenzione del microscopio, che ha reso visibile un mondo biologico vasto: metazoi, protozoi, alghe, funghi, batteri e virus [Poli *et al.*, 2005].

Seguì poi la scoperta del ruolo dei singoli microrganismi quali agenti eziologici di malattia (Robert Koch), che ha visto uno sviluppo della ricerca rivolto all'isolamento e alla coltivazione degli agenti morbigeni, oltre ad uno studio più peculiare, indirizzato alla comprensione dei meccanismi patogenetici di malattia e del percorso di guarigione (Louis Pasteur) [Poli *et al.*, 2005].

Successivamente, vennero isolate le prime sostanze ad attività antimicrobica, fino alla produzione di molecole di sintesi: è nello stesso anno della morte di Pasteur che un ricercatore italiano, Vincenzo Tiberio, descrisse il potere battericida di alcune muffe, anticipando di trent'anni la scoperta della penicillina da parte di Alexander Fleming [<http://www.agenziafarmaco.gov.it/it/content/storia-dei-farmaci-la-scoperta-degli-antimicrobici>].

Da allora, vennero sintetizzate numerose classi di antimicrobici, fino all'evidenza che i microrganismi, sotto la pressione selettiva degli antimicrobici, seguendo la legge evolutivistica che premia chi presenta caratteristiche vantaggiose, erano in grado di resistere all'insulto farmacologico. Da questo momento in poi, si sono susseguite indagini volte a comprendere il fenomeno, la sua diffusione, i meccanismi che vi sono alla base, fino alle strategie per contrastarlo [Cassone, 2001].

Tale lavoro di tesi si inserisce in questo ambito, con l'intento di fornire ulteriori dati in merito ai profili fenotipici e genotipi di resistenza in ceppi di *Salmonella* spp. isolati da popolazioni canine in Italia.

Dal momento che i microrganismi sviluppano resistenza con una velocità maggiore rispetto a quella necessaria per la sintesi di nuove molecole antimicrobiche, essendo in grado di trasferire tale resistenza non solo alle generazioni figlie ma anche per via orizzontale, con la possibilità di cross-resistenza verso altre molecole o in altri ospiti, ad oggi l'antibiotico-resistenza è considerato tra i più importanti problemi che la sanità mondiale deve affrontare.

## **Salmonellosi e antibiotico resistenza: due priorità in sanità pubblica.**

### **1. La rilevanza delle Salmonellosi.**

Col termine Salmonellosi si definisce l'insieme di manifestazioni morbose sostenute da *Salmonella* spp. a decorso variabile, acuto, sub-acuto e cronico: esse includono la più comune gastroenterite, fino alla possibilità, per il batterio, di causare malattie a localizzazioni extra-intestinale, come endocarditi, polmoniti, meningiti, osteomieliti ed artriti, pielonefriti [Miller *et al.*, 1995]. Dall'elenco delle patologie che il microrganismo è in grado di provocare, si comprende immediatamente la rilevanza che assume il tema "Salmonellosi" in materia di salute pubblica. La malattia è sottoposta ad obbligo di notifica per il medico, secondo il Decreto Ministeriale del 15 dicembre 1990; lo stesso dicasi per il veterinario, il quale deve denunciare i casi di Salmonellosi, come prescritto nell'articolo 1 del Regolamento di Polizia Veterinaria. L'*Office International des Epizooties* (OIE) colloca *Salmonella* tra i batteri da sottoporre a controllo, considerata la priorità che assumono su scala mondiale [Knight-Jones *et al.*, 2010]. La diffusione di questo microrganismo è dovuta *in primis* all'esistenza di serbatoi animali, nel più vasto senso del termine. Nessun Paese può dirsi immune: il batterio viene isolato nelle regioni più diverse del globo, per clima, situazione economica e sociale ed il relativo livello sanitario raggiunto [Vannugli, 1976]. Oltre ai *reservoir* animali, un ruolo importante nella distribuzione mondiale del microrganismo è da imputare sicuramente anche al fenomeno della globalizzazione: tale dato è suffragato dal fatto che sierotipi un tempo sconosciuti in alcune regioni, vi fanno la loro comparsa, grazie all'enorme circolazione di merci, persone e animali nel mondo. L'ubiquità di *Salmonella* spp. è confermata da diverse pubblicazioni, la più nota delle quali è ad opera di Drager del 1971.

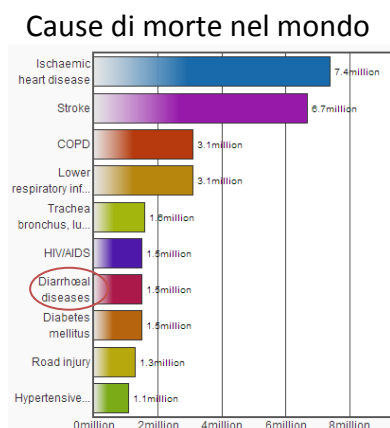
La rilevanza della Salmonellosi è infine collegata all'elevata morbilità e al peso che riveste, in termini economici, specialmente nel caso in cui si verificano epidemie [Galetta *et al.*, 2003]. Tenuto conto della complessità del tema, l'Organizzazione Mondiale della Sanità pone tra i suoi obiettivi la lotta alla malattia negli animali e la prevenzione delle infezioni nell'uomo: questa attività si esplica nel "Programma di sorveglianza internazionale", varato nel 1967 in Europa, esteso poi a tutte le regioni del Mondo [Scuderi, 2000].

Per comprendere la dimensione del problema, si riportano le stime dell'Osservatorio sulla Salute Mondiale: le gastroenteriti infettive, di cui la Salmonellosi fa parte nella sua forma più frequente, rappresentano una delle prime dieci cause di morte nel globo, divenendone la terza nei Paesi in via di sviluppo, come riportato nel grafico 1.1 [[http://www.who.int/gho/mortality\\_burden\\_disease/en/](http://www.who.int/gho/mortality_burden_disease/en/)].

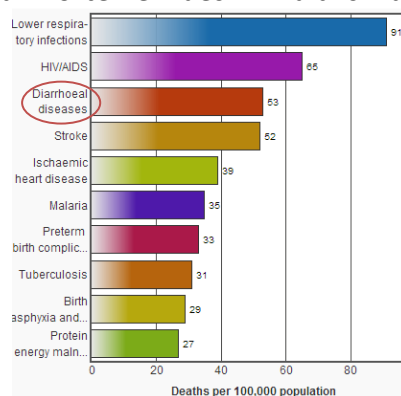


## Grafico 1.1

Le prime dieci cause di morte nel 2012:  
confronto tra la situazione mondiale e quella nei Paesi in via di sviluppo.



## Cause di morte nei Paesi in via di sviluppo



Fonte: Osservatorio sulla Salute Mondiale, maggio 2014

Secondo l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS), ogni anno i casi di Salmonellosi umana nel mondo sono ritenuti aggirarsi attorno a decine di milioni di casi, la maggior parte dei quali si dimostra essere di lieve entità ma, una parte di essi ha esito infausto, stimato in 100.000 decessi l'anno.

Per valutare i possibili aspetti del problema e validare strategie adeguate, l'OMS si avvale del programma *Global Foodborne Infections Network* (GFN), precedentemente noto col nome *Global-Salm SURV* (GSS): iniziato nel gennaio del 2000, tale progetto congloba attualmente una rete di 1857 membri in 185 Paesi del mondo, con l'obiettivo primario di rafforzare l'attività di sorveglianza su *Salmonella* nell'uomo, negli animali e negli alimenti. Il piano strategico elaborato dal GFN per il quinquennio 2011-2015 prevede sostanzialmente il rafforzamento nazionale e regionale della capacità di sorveglianza, ricerca, prevenzione e controllo delle tossinfezioni alimentari e delle infezioni enteriche. La sorveglianza internazionale permette di indicare le fonti, i sierotipi di nuova comparsa, senza l'analisi dei quali non è possibile formulare adeguate strategie di lotta al problema [[http://www.who.int/gfn/publications/strategic\\_plan\\_2011/en/](http://www.who.int/gfn/publications/strategic_plan_2011/en/)].

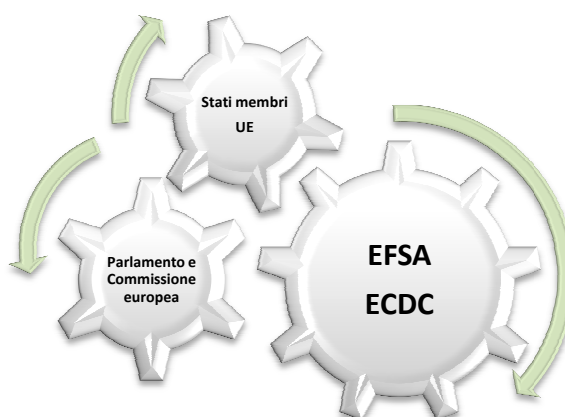
## 1.1 L'attività di sorveglianza in Europa.

*Salmonella* è un agente zoonotico da sottoporre a sorveglianza, come riportato nell'allegato I della Direttiva CE 99/2003, nota anche come "Direttiva Zoonosi": gli Stati Membri dell'Unione Europea devono raccogliere i dati sugli episodi indagati e trasmetterli agli organismi competenti; tra questi enti figurano l'*European Food Safety Authority* (EFSA) ed il Centro Europeo per la Prevenzione e il Controllo delle Malattie (ECDC). Tali organizzazioni forniscono inoltre la consulenza scientifica necessaria ai decisori politici, Parlamento europeo e Commissione europea, per la formulazione di adeguate strategie applicabili negli Stati Membri, secondo uno schema di tipo circolare, come esemplificato in figura 1.1.1.

**Figura 1.1.1**

---

*I protagonisti nella lotta alle Salmonellosi in Europa.*

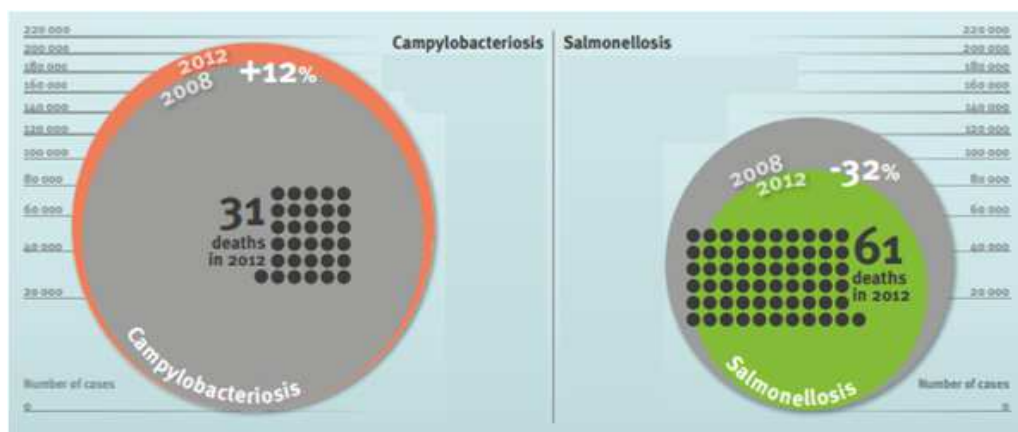


Le indicazioni formulate dal reparto scientifico sono elaborate con obiettivo ultimo la riduzione della prevalenza comunitaria di *Salmonella* spp. nell'uomo; per raggiungere questo fine, è propedeutica la diminuzione della prevalenza negli animali. Per questo motivo la Commissione Europea ha decretato l'applicazione di misure di controllo nel settore veterinario: queste si sono esplicitate principalmente nei "Piani potenziati di controllo nel pollame", fino all'attuazione di misure di restrizione per la movimentazione di prodotti da allevamenti infetti [<http://www.efsa.europa.eu/it/topics/topic/Salmonella.htm>]. Il piano attualmente in corso coinvolge il monitoraggio degli allevamenti di ovaiole, polli e tacchini da riproduzione e da ingrasso: questi sono sottoposti a controlli sistematici da parte dei veterinari ed a piani di campionamento in autocontrollo e ufficiale. Il primo programma europeo creato *ad hoc* per il monitoraggio di *Salmonella* spp. è stato Salm-Net, iniziato nel 1994, al quale parteciparono 15

Paesi europei; successivamente la sorveglianza si è estesa ad altri agenti patogeni, come *E. coli* O 157, all'interno di un progetto più ampio, noto con l'acronimo ENTER-NET (*Enteric Pathogen Network*). Questo programma, quando nel 2006 è passato sotto il coordinamento dell'ECDC, è stato incorporato nel *Foodborne and Waterborne Diseases* (FDW) che ha unificato la sorveglianza epidemiologica delle malattie trasmesse da alimenti ed i patogeni ad essi associati, come *Salmonella* spp.: tra i suoi obiettivi vi sono il miglioramento delle conoscenze circa i patogeni, i fattori di rischio, i focolai che si sviluppano a livello transnazionale, nonché la creazione di una rete di pronta risposta in caso di emergenze. I dati che emergono da questi sistemi di sorveglianza attestano la Salmonellosi al secondo posto per frequenza tra le tossinfezioni alimentari, preceduta solo dalla Campilobatteriosi. E' da segnalare, però, che nel 2012 *Campylobacter* ha fatto registrare 31 decessi mentre *Salmonella* il doppio, come esemplificato in figura 1.1.2 [[http://www.ecdc.europa.eu/en/healthtopics/food\\_and\\_waterborne\\_disease/Documents/Zoonose%202014\\_SCREEN.pdf](http://www.ecdc.europa.eu/en/healthtopics/food_and_waterborne_disease/Documents/Zoonose%202014_SCREEN.pdf)].

**Figura 1.1.2**

*Confronto tra Salmonellosi e Campilobatteriosi: numero di casi e decessi nel 2008 nel 2012.*



Fonte: European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic agents and Food-borne Outbreaks in 2012, published by EFSA & ECDC in 2014

Vista la rilevanza del problema, è utile disporre di un sistema di rapida allerta, specialmente in caso di eventi epidemici: tale sistema è disponibile dal 1 marzo 2010, con l'attivazione della piattaforma EPIS appartenente al programma FWD [Luzzi, 2003].

Il monitoraggio della prevalenza di *Salmonella* spp. non si ferma solamente alla filiera alimentare ma EFSA ed ECDC raccolgono i dati provenienti dagli Stati Membri circa l'infezione nell'uomo e negli animali; questi sono poi analizzati e pubblicati in relazioni, con cadenza annuale. Secondo il parere dell'EFSA il 75% delle nuove malattie che hanno colpito l'uomo negli ultimi dieci anni è stato trasmesso da animali o prodotti di origine animale [<http://www.efsa.europa.eu/it/topics/topic/zoonoticdiseases.htm>].

Per quanto riguarda il “caso *Salmonella*”, si registra un *trend* in diminuzione delle notifiche. I dati più aggiornati rilevano oltre 90.000 casi di Salmonellosi stimati nell’uomo in Europa, con una spesa economica globale che ammonta a 3 miliardi di euro l’anno. Grazie al successo delle misure di controllo sopra citate, si è contribuito al quasi dimezzamento dei casi di Salmonellosi umana dagli anni 2004 al 2010 in tutta Europa [<http://www.efsa.europa.eu/it/topics/topic/Salmonella.htm>]. Visti i risultati ottenuti, l’attività di sorveglianza così delineata, secondo una rete integrata tra rilievi umani, alimentari ed animali, è di cruciale importanza e rappresenta un sistema efficace nella lotta al problema.

## 1.2 Il caso italiano: la collaborazione tra ENTER-NET Italia ed Enter-Vet.

Dal 1994 l'Italia partecipa al programma di sorveglianza Salm-Net, come uno dei 15 Paesi europei in cui si localizza una rete di laboratori di riferimento in materia.

In questo progetto hanno fatto capo, tre anni più tardi, la sorveglianza verso le infezioni sostenute da *E. coli* O157 e altri VTEC (*E. coli* produttori di verocitotossine) ed il monitoraggio dell'antibiotico-resistenza, sotto l'acronimo di ENTER-NET (*Enteric Pathogen Network*), inizialmente coordinato dall'*Health Protection Agency* (HPA), poi affidato all'*European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC).

Attualmente prendono parte alla rete di sorveglianza ENTER-NET 23 Paesi europei, con la collaborazione di altri extraeuropei come Australia, Canada, Sud Africa e Giappone.

In Italia l'Istituto Superiore di Sanità (ISS) coordina l'attività del laboratorio periferico italiano (ENTER-NET Italia), avvalendosi della collaborazione del Sistema Sanitario Nazionale (SSN), Società scientifiche, Università.

All'Istituto Superiore di Sanità pervengono i dati raccolti a livello nazionale, circa gli isolamenti, le fonti, le tipizzazioni sierologiche, l'analisi dei saggi di sensibilità agli antimicrobici degli enteropatogeni monitorati: l'ISS provvede ad inviare questi dati al centro europeo di coordinamento, con cadenza trimestrale.

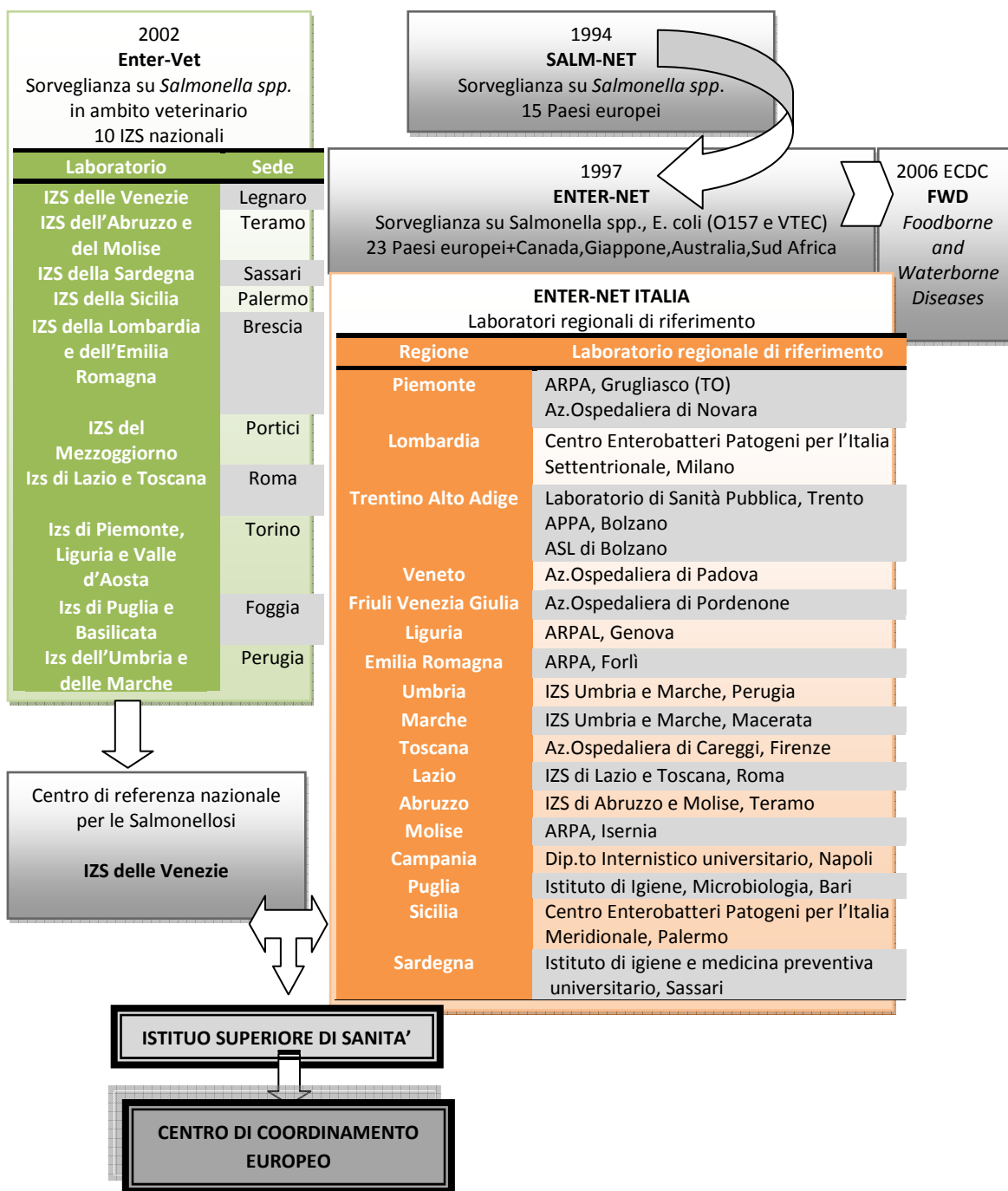
Il successo di questo sistema che ha permesso di ottenere un dettagliato quadro epidemiologico della Salmonellosi umana, ha portato all'attivazione della rete Enter-Vet, che concerne le notifiche degli isolamenti di *Salmonella* in ambito veterinario: il sistema raccoglie i dati provenienti dai dieci Istituti Zooprofilattici Sperimentali (IZS) del territorio nazionale, sotto il coordinamento dell'IZS delle Venezie (IZSve), che rappresenta il centro di riferimento nazionale per le Salmonellosi.

In Italia la rete integrata ENTER-NET ed Enter-Vet permette, mediante l'analisi di dati proveniente da isolamenti umani, animali, alimentari ed ambientali, di ottenere un quadro completo delle caratteristiche ecologiche ed epidemiologiche di *Salmonella* spp., nonché le più interessanti acquisizioni circa la patogenicità ed i test di sensibilità agli antimicrobici.

In primo luogo, nella rete di laboratori predisposti alla sorveglianza, vengono isolati ed identificati gli stipti batterici patogeni; le salmonelle sono tipizzate per poi venire sottoposte ai test di sensibilità agli antimicrobici, secondo le linee guida NCCLS (*National Committee for Clinical Laboratory Standards*) e ad altre tipizzazioni di carattere fenotipico e genotipico.

### Schema 1.2.1

Sorveglianza di Salmonella: ripartizione delle competenze territoriali e flusso di dati.



Sulla base dei dati della sorveglianza nell'uomo, l'UE indirizza i programmi di controllo nella veterinaria, integrandoli con quelli di prevenzione in medicina umana.

Inoltre, nel nostro Paese, l'attività di sorveglianza delle zoonosi è fondata sulla collaborazione tra i servizi veterinari e quelli di igiene delle Aziende Sanitarie Locali (ASL), appartenenti al sistema sanitario nazionale.

In ambito veterinario l'attività da svolgere si basa sul Regolamento di Polizia Veterinaria (DPR

320/54 e successive modifiche): esso prevede che una serie di malattie o casi sospetti, tra cui la Salmonellosi, siano sottoposte a denuncia da parte di veterinari pubblici e liberi professionisti, funzionari di pubblica sicurezza, allevatori ed altre figure. In seguito, il Servizio Veterinario deve informare il Servizio di Igiene circa le notifiche, e lo stesso deve avvenire in senso opposto, secondo un approccio integrato, multidisciplinare e collaborativo, nell'ottica della "One Health" quale modello auspicabile e positivo in un campo così vasto, comune alla veterinaria e medicina umana, come le zoonosi.

***Figura 1.2.2***

---

*Interazione tra i servizi preposti alla sorveglianza delle zoonosi all'interno dell'ASL.*



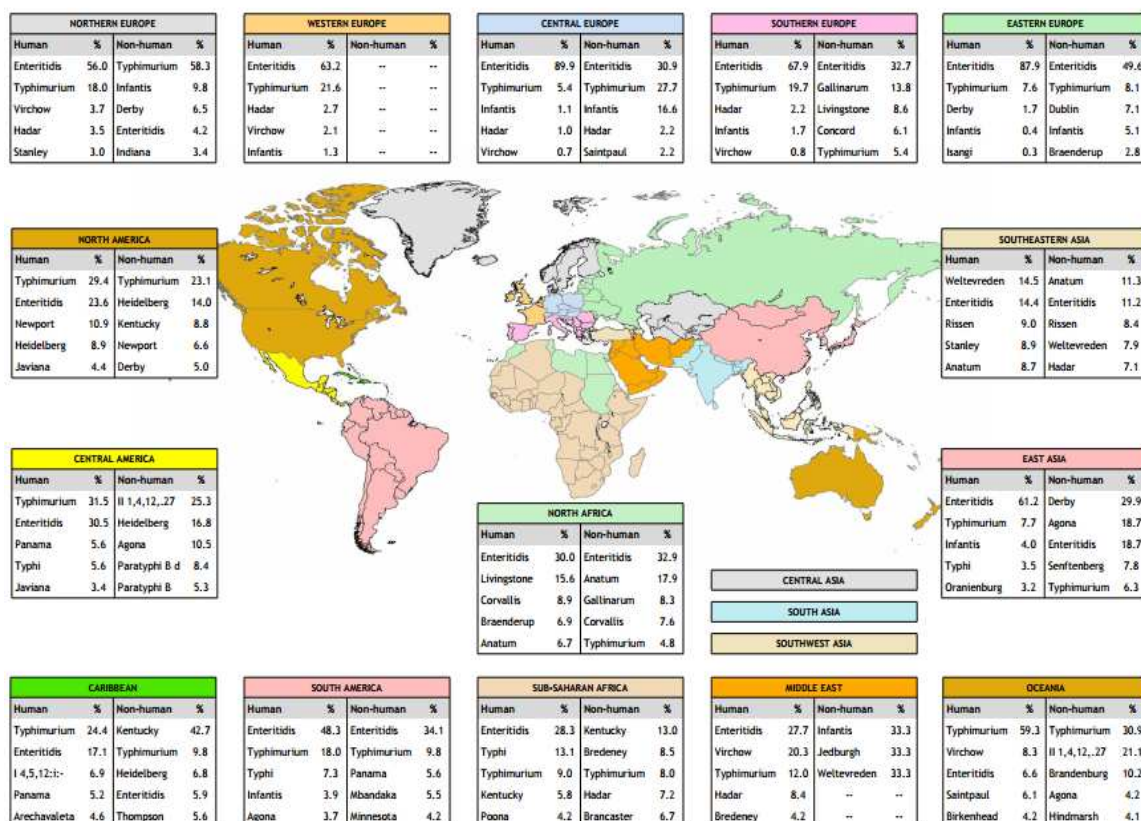
### 1.3 Gli isolamenti di *Salmonella* spp. da fonti umane e non umane.

Un quadro mondiale della diffusione di *Salmonella* spp. è fornito dal programma *Global Foodborne Infections Network* (GFN), operativo dal gennaio del 2000. Da questo sistema, cui partecipano 185 Paesi del mondo, è nato un database internazionale disponibile online, da cui attingere dati derivanti dall'attività di sorveglianza su *Salmonella* spp. nell'uomo, negli animali e negli alimenti. In particolare si possono reperire i risultati annuali circa le numerosità degli isolamenti, i più frequenti sierotipi circolanti nelle varie regioni del mondo oltre ai saggi di sensibilità antimicrobica.

Nel grafico sottostante sono riassunti i risultati dell'attività del GFN dal 1995 al 2008, che ha visto l'analisi di 1,5 milioni di isolati umani e 360.000 non umani (grafico 1.3.1).

**Grafico 1.3.1**

*Epidemiologia locale dei cinque sierotipi più frequenti di Salmonella provenienti da isolati umani e non umani (animali, ambiente, alimenti, mangimi) dei Paesi partecipanti al programma Global Foodborne Infections Network, dal 1995 al 2008.*



Fonte: WHO *Global Foodborne Infection Network*, settembre 2009

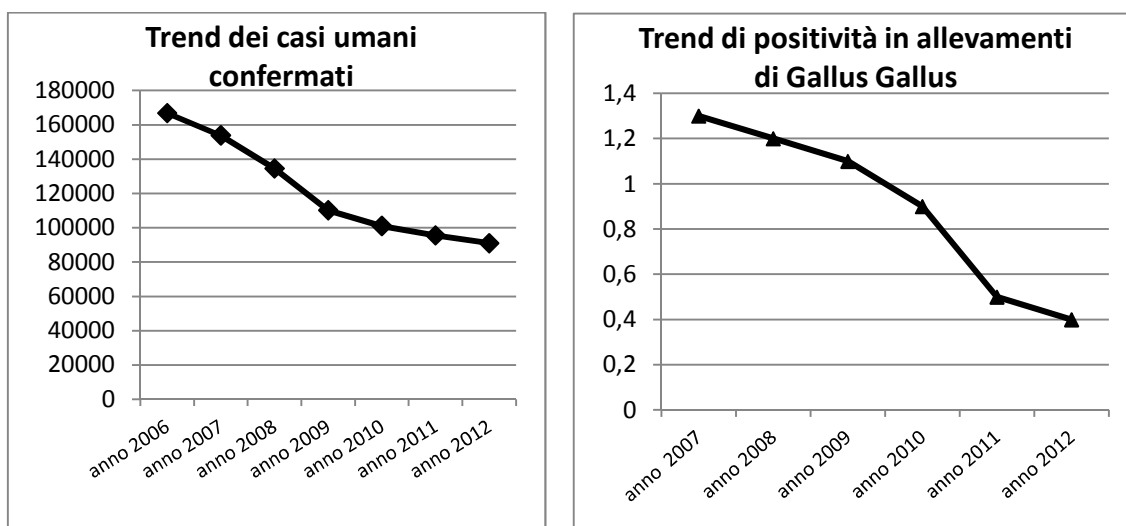


I Paesi partecipanti al programma sono stati suddivisi in 18 macroregioni, sulla base di criteri geografici ed epidemiologici. Di queste, 14 sono state in grado di fornire dati sia riguardo gli isolamenti umani che non umani; in totale sono stati isolati 307 sierotipi diversi, rappresentati per il 78,8% dei campioni di provenienza umana, dai serovar *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis*, i quali hanno costituito il 37,9% degli isolati non umani. L'analisi di questi dati permette di comprendere il quadro della situazione mondiale riferita a *Salmonella* spp., oltre alla formulazione di nessi ipotetici tra i *reservoir* animali e la malattia nell'uomo.

Per quanto riguarda la situazione a livello europeo, i sierotipi più frequentemente isolati nell'uomo sono *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*, in accordo col dato globale; dagli isolamenti non umani sono stati rinvenuti con maggior frequenza gli stessi serovar citati per l'uomo ed, in aggiunta, *S. Gallinarum*. Il trend registrato tra il 2005 ed il 2009 nel continente europeo segna una netta diminuzione della prevalenza di *Salmonella* spp. negli animali, negli alimenti e nell'uomo [<http://www.efsa.europa.eu/it/topics/topic/Salmonella.htm>].

### **Grafico 1.3.2**

*Confronto tra i casi confermati di Salmonellosi nell'uomo (in UE dal 2008 al 2012) e la positività per Salmonella negli allevamenti di Gallus Gallus (in UE dal 2007 al 2012)*  
 [EU summary report on zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks 2012.  
 EFSA, 2014 ]



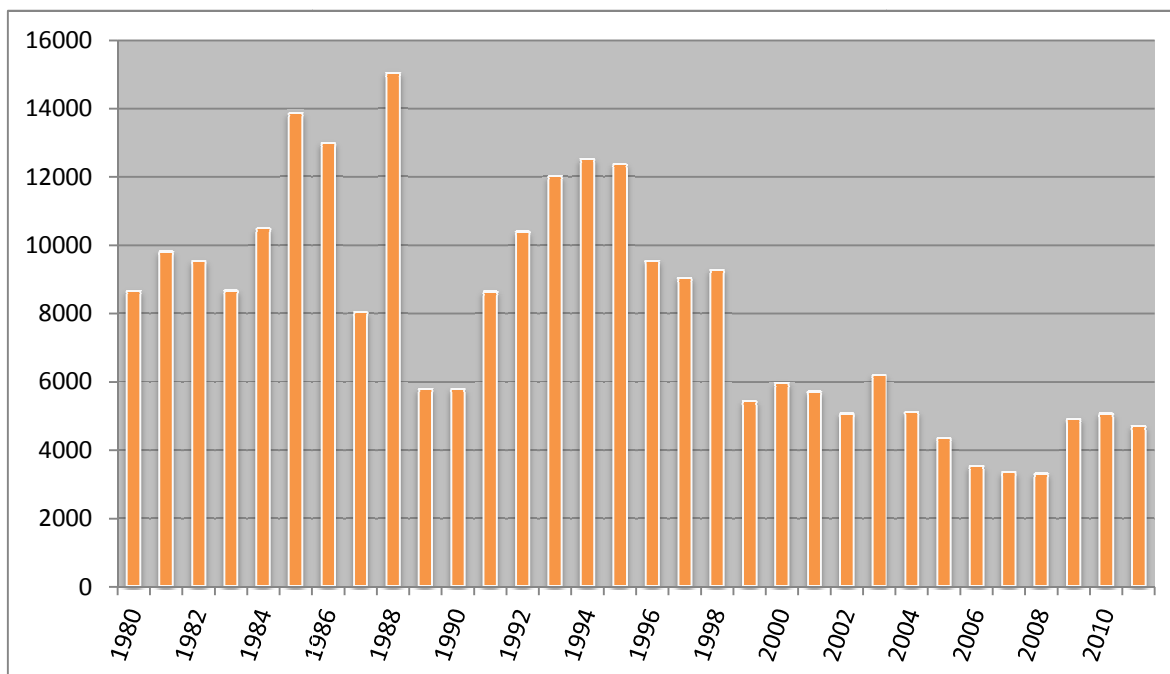
Per analizzare la situazione italiana, è possibile interrogare sia direttamente il sistema GFN, sia i programmi ENTER-NET Italia ed Enter-Vet. I dati reperibili dalla prima piattaforma forniscono una classifica dei quindici sierotipi più frequentemente isolati nell'uomo dal 1999 al 2004.

I dati storici provenienti dal programma ENTER-NET Italia raccolgono i casi di salmonellosi umana verificatisi dal 1980 al 2011, riportando il numero di isolamenti oltre alla ripartizione percentuale dei sierotipi più diffusi. Come visibile nel grafico sottostante, si registra un trend in diminuzione

degli isolamenti umani dal 1980 a oggi, in accordo con la situazione europea [<http://www.epicentro.iss.it/problemi/Salmonella/epid.asp>].

### **Grafico 1.3.3**

*Numero di isolamenti di Salmonella da casi umani dal 1980 al 2011, in Italia.*



Gli isolamenti provenienti dal sistema Enter-Vet nel suo primo anno di attività, il 2002, riguardano 4.550 ceppi tipizzati presso gli Istituti Zooprofilattici Sperimentali parte della rete, sotto il coordinamento del centro di riferimento IZS delle Venezie.

I campioni analizzati sono stati classificati in base alla provenienza, animale, alimentare, ambientale o altre fonti non note. I risultati, esemplificati nella tabella sottostante, vedono al primo posto per frequenza il sierotipo *S. Typhimurium* (22,68%) seguito da *S. Derby* (7,14%), *S. Hadar* (6,64%), *S. Blockley* (5,63%) e *S. Heidelberg* (4,77%) mentre *S. Enteritidis* rappresenta il 3,34% degli isolati.

Per confrontare questi dati con quelli provenienti dagli isolamenti umani, viene interrogato il sistema ENTER-NET Italia, per conoscere i sierotipi e le frequenze trovate nel medesimo anno: dalla consultazione di questi, emerge che *S. Typhimurium* è il sierotipo più frequente (46,3%), seguito da *S. Enteritidis*, *S. Infantis*, *S. Derby*, *S. Heidelberg*, *S. Brandenburg*, *S. Blockley* e *S. Hadar* [<http://www.sivempveneto.it/vedi-tutte/4691-principali-sierotipi-Salmonella-dati-raccolti-a-livello-nazionale-rete-di-sorveglianza-enter-vet>].

Risulta dunque evidente che tutti i sierotipi isolati dagli animali circolano anche nella popolazione umana e che *S. Typhimurium* sia il *serovar* più frequente, così tra gli animali come nell'uomo.

### **Grafico 1.3.4**

*Confronto tra i sierotipi più frequentemente isolati da campioni umani e non umani, durante l'attività di ENTER-NET Italia ed Enter-Vet nell'anno 2002.*

Sierotipo	Frequenza % del sierotipo da fonte umana	Frequenza % del sierotipo da fonte non umana
<b>Typhimurium</b>	46,3	22,7
<b>Derby</b>	1,6	7,1
<b>Hadar</b>	1,4	6,6
<b>Blockley</b>	1,4	5,6
<b>Heidelberg</b>	1,6	4,8
<b>Enteriditis</b>	28,4	3,3
<b>Infantis</b>	3,1	2,4
<b>Brandenburg</b>	1,4	1

I report più aggiornati disponibili a riguardo sia degli isolamenti da fonte umana che animale, confermano il primato della frequenza per *S. Typhimurium*.

### **Grafico 1.3.5**

*Confronto tra i sierotipi più frequentemente isolati da campioni umani e non umani, durante l'attività di ENTER-NET Italia ed Enter-Vet nell'anno 2009.*

Sierotipo	Frequenza % del sierotipo da fonte umana	Frequenza % del sierotipo da fonte non umana
<b>Typhimurium</b>	40	10,35
<b>Enteriditis</b>	14	7,82
<b>Derby</b>	3,1	4,98
<b>Hadar</b>	1,1	4,61
<b>Infantis</b>	2,8	2,82

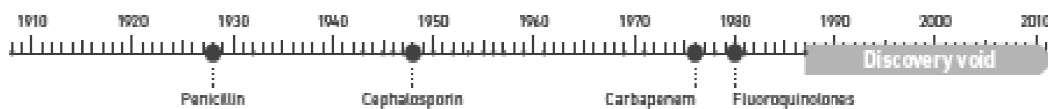
- **L'antibiotico-resistenza.**

## 2. La chemioterapia antibiotica: dalle origini alla resistenza.

La scoperta degli antimicrobici, che risale alla seconda metà del secolo scorso, ha segnato una svolta epocale nella medicina, permettendo di combattere malattie “storiche” quali tifo, colera, tubercolosi. Fu Paul Ehrlich, universalmente considerato il padre della chemioterapia, ad ipotizzare la possibilità, per talune sostanze, di uccidere i microrganismi o inibirne la moltiplicazione [Poli *et al.*, 2005]. Le successive acquisizioni in materia, da parte di Alexander Fleming e Gerhard Domagk, hanno portato al fiorire della chemioterapia, mediante l'impiego di composti naturali o di sintesi. La conseguente disponibilità di farmaci efficaci nei confronti di varie patologie ha generato l'illusione che le malattie infettive fossero debellate per sempre [Pantosi e Del Grosso, 2009]. In realtà, l'uso massivo di queste molecole ha portato alla selezione di popolazioni batteriche antimicrobicoresistenti, facendo profilare un regresso delle opzioni terapeutiche all'era pre-antibiotica. Infatti, grazie alla pressione selettiva esercitata dai farmaci sui batteri, questi ultimi hanno risposto all'insulto farmacologico con la comparsa di caratteristiche che li rendevano resistenti [Cassone, 2001]. Se un tempo, a fronte della progressiva perdita di efficacia delle molecole antimicrobiche, vi era la sintesi e introduzione di nuove molecole (dal 1945 al 1960 sono state messe sul mercato venti classi diverse di antimicrobici), negli ultimi decenni tale declino non è stato compensato dalla disponibilità di nuovi farmaci efficaci [Cassone e Carinci, 2009]. Per colmare questo vuoto, l'agenzia americana per le malattie infettive ha lanciato il progetto “10x20”, con l'intento di produrre dieci nuovi antimicrobici entro il 2020 [[http://www.quotidianosanita.it/scienza-e-farmaci/articolo.php?articolo\\_id=18213](http://www.quotidianosanita.it/scienza-e-farmaci/articolo.php?articolo_id=18213)].

**Figura 2.1**

*La sintesi degli antimicrobici: il vuoto temporale dal 1980 ad oggi.*



Fonte: WHO, Global Report on Surveillance, 2014

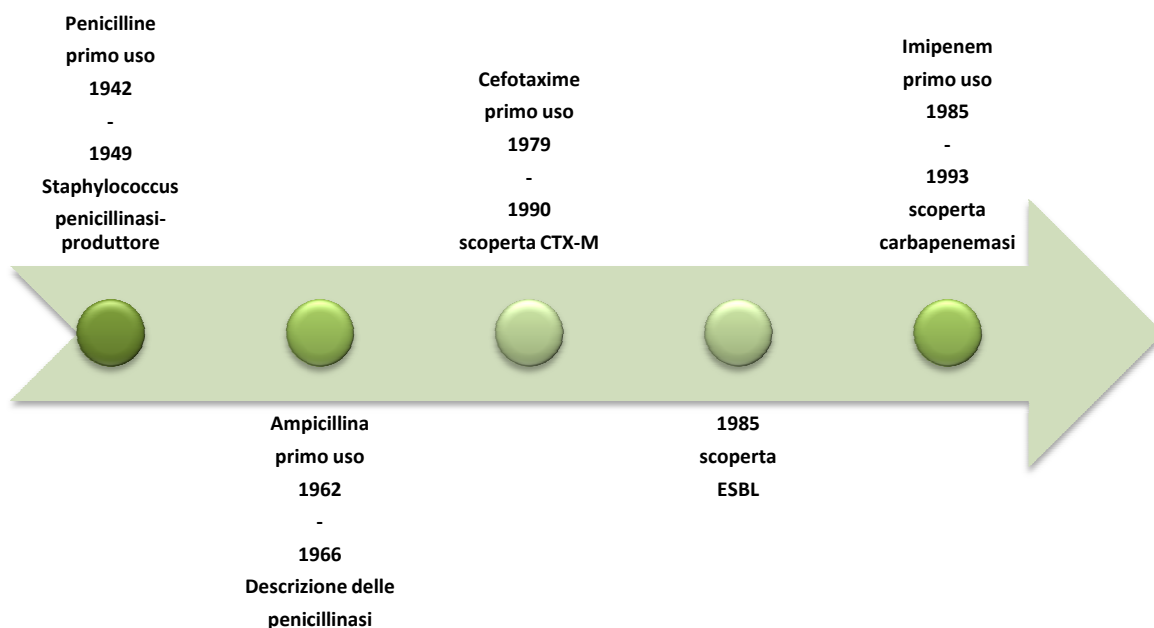
La carenza di terapie efficaci nei confronti di determinati patogeni è una minaccia alla salute pubblica, responsabile di oltre 25.000 decessi l'anno nella sola Unione Europea

[<http://www.ilfattoquotidiano.it/2013/02/04/antibiotici-scoperta-molecola-per-combattere-lantibiotico-resistenza/488698/>].

L'antibiotico-resistenza è un problema balzato agli onori della cronaca con la nascita della chemioterapia ed è in continuo aumento. Come si può notare nella figura sottostante, poco dopo l'introduzione di una classe di farmaci, i batteri hanno fatto registrare la resistenza, ed è stato così per tutte le molecole a seguire. Pertanto probabilmente la soluzione al problema risiede nella razionalizzazione dell'uso degli antimicrobici, prima della sintesi di nuovi: è difatti documentata la relazione tra la frequenza di antibiotico-resistenza e densità di consumo [Goosens *et al.*, 2005]. Inoltre il costo, dall'ideazione alla commercializzazione di un nuovo farmaco, si aggira tra i 640 milioni di euro: una spesa sicuramente non trascurabile [<http://www.ilfattoquotidiano.it/2013/02/04/antimicrobici-scoperta-molecola-per-combattere-lantibiotico-resistenza/488698/>].

### **Figura 2.2**

*Confronto tra la data di introduzione e l'evidenza delle resistenze:  
l'esempio dei beta-lattamici.*



I meccanismi sottostanti la resistenza sono diversi: si cita la resistenza di origine naturale, dovuta alle caratteristiche intrinseche del microrganismo, e la resistenza acquisita, rappresentata da variazioni nel profilo di sensibilità del batterio, ottenuta tramite mutazioni cromosomiche o per mezzo di trasferimento di materiale extra-cromosomico tra i microrganismi.

Secondo uno studio condotto da Nesme ed altri Autori (2014), i geni dell'antibiotico-resistenza sono ubiquitari: dall'analisi di 71 ambienti diversi, non clinici tra cui il suolo e le acque oceaniche,

sono stati sequenziali i genomi batterici confrontandoli con quelli degli agenti patogeni responsabili delle malattie nell'uomo; si è scoperto che i geni dell'antibiotico-resistenza sono distribuiti in tutto l'ecosistema, con maggior frequenza nel suolo.

Gli Autori concludono che una delle strategie da mettere in campo per la lotta al fenomeno sia lo studio dei meccanismi che impediscono ai geni della resistenza di passare tra i microrganismi che li possiedono e le altre popolazioni batteriche presenti nell'ambiente [Monzeglio, 2014].

Un importante risultato in questo senso è stato fatto registrare da un'*equipe* dell'università del *North Carolina*: i ricercatori hanno recentemente sintetizzato una molecola in grado di inattivare un enzima responsabile della trasmissione, tra batteri, dei geni della resistenza. Questo nuovo impulso della ricerca probabilmente segnerà una svolta nella lotta al fenomeno dell'antibiotico-resistenza, scongiurando lo scenario figurato dall'OMS di un'era post-antibiotica in cui infezioni comuni e malattie "minori" possono uccidere [Fukuda, 2014].

## 2.1 Il monitoraggio del fenomeno.

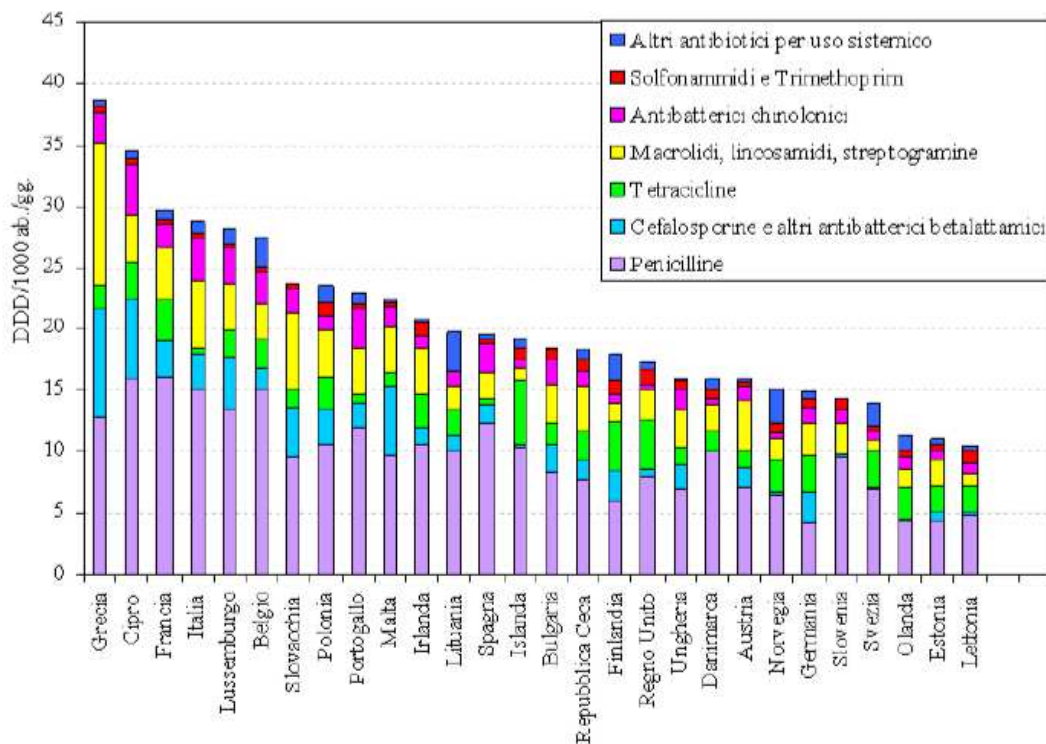
L'antibiotico-resistenza è attualmente considerata un fenomeno emergente, uno dei più gravi problemi di sanità pubblica a livello mondiale: dagli anni '90 ad oggi si sono avvicinati numerosi pareri da parte del mondo scientifico, sotto forma di raccomandazioni e linee guida da seguire per ridimensionare il fenomeno [Pantosi e Del Grosso, 2009]. Esempi ne sono la conferenza "The Microbial Threat" del 1997, in cui si esponeva l'assunto che una minaccia globale necessitava certamente di un intervento integrato: sistemi di sorveglianza e raccolta dati a livello nazionale, messi in relazione tra tutti i continenti, per delineare un quadro globale del fenomeno. Un anno dopo è la volta delle "Raccomandazioni di Copenaghen", le quali prevedevano la valutazione di benefici e rischi nell'uso di antimicrobici, l'introduzione di sistemi per la rilevazione di acquisti e consumo degli stessi, oltre all'incoraggiamento delle ricerche sul tema [The Copenhagen Recommendations, 1998]. Nel 1999 il Consiglio dell'Unione Europea elabora il documento "Una strategia contro la minaccia microbica", recependo le raccomandazioni divulgate in precedenza: prevenzione, sorveglianza, ricerca, cooperazione internazionale. Da questi presupposti, nel 2001, nasce il progetto EARSS (*European Antimicrobial Resistance Surveillance System*) attualmente coordinato dall'ECDC, che raccoglie i dati provenienti dal continente europeo. Online sono disponibili i risultati dell'attività di sorveglianza, al portale EARS-Net (*European Antimicrobial Resistance Network*): sono monitorate le resistenze verso classi di farmaci differenti da parte dei patogeni *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, *Streptococcus pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*. I risultati esposti nel report dell'attività svolta da EARSS nel 2012 registrano che la maggior parte di *E. coli* e *K. pneumoniae* isolati nel 2012 sono resistenti ad almeno un farmaco oggetto dei test e, buona parte dei ceppi, mostra resistenza combinata alle cefalosporine di terza generazione, fluorchinoloni e amminoglicosidi [Summary of the last data on antibiotic resistance in the European Union, ECDC, 2013]. Il trend rilevato è di un continuo aumento dell'antibiotico-resistenza in oltre un terzo dei Paesi europei negli ultimi anni, e un aumento delle percentuali di ceppi produttori di beta-lattamasi ad ampio spettro (ESBL). Viene segnalata inoltre, un'alta percentuale di antibiotico-resistenza tra i batteri Gram negativi, sottolineando la continua perdita di efficacia delle terapie e la necessità di una strategia condivisa su più fronti [<http://www.agenziafarmaco.gov.it/it/content/al-la-terza-edizione-della-campagna-di-comunicazione-dellaifa-antimicrobici-difendi-la-tua-dif>].

Altro programma europeo è quello sul controllo del consumo degli antimicrobici, ritenuto correlato alla frequenza delle resistenze [Goosens *et al.*, 2005].

Il monitoraggio del consumo è oggetto del sistema ESAC (*European Surveillance of Antimicrobial Consumption*) coordinato dall'ECDC (*European Centre for Disease Prevention and Control*).

**Tabella 2.1.1**

Consumo delle principali classi di antibiotici per uso sistemico in 28 Paesi dell'UE nel 2009.



Fonte: ESAC

Come emerge dai dati sopra riportati, l'Italia si attesta tra i Paesi con i più alti consumi di antimicrobici e, in relazione ad essi, i più alti tassi di resistenze [Pantosi e Del Grosso, 2009].

La sorveglianza dell'antibiotico-resistenza a livello mondiale è stata oggetto del *report "Antimicrobial Resistance – Global Report on Surveillance"* pubblicato dall'OMS nel 2014, il quale fornisce un quadro globale del fenomeno, contemplando gli agenti patogeni più importanti, per frequenza e rilevanza delle infezioni. In particolare, sono analizzati la resistenza alle cefalosporine di terza generazione ed i fluorochinoloni in *E. coli*, quella alle cefalosporine di terza generazione ed ai carbapenemi in *K. pneumoniae*, *Staphylococcus* meticillino-resistenti, la sensibilità di *S. pneumoniae* alle penicilline, la resistenza ai fluorochinoloni in *Salmonelle non tifoidi*, e la stessa famiglia di farmaci in *Shigella* spp. . Nel *report* si sottolinea la necessità di colmare alcune lacune, come la mancata standardizzazione nelle procedure utilizzate tra i diversi Paesi (quali campioni analizzare, come farlo, come compilare i dati e divulgarli) nonché rafforzare



la collaborazione per una sorveglianza stringente, integrando i dati sull'antimicrobicoresistenza da isolati umani e non umani (animali da reddito, filiera produttiva ecc.).

La comunità scientifica internazionale è concorde nel sostenere la necessità di misure che portino ad uso corretto e razionale degli antimicrobici, ritenendo l'uso inappropriato degli stessi, un motivo di accelerazione del fenomeno [Krag, 1997]. In questo senso è indispensabile l'istruzione dei cittadini che svolgono un ruolo non trascurabile: essi infatti praticano spesso l'automedicazione, sulla base di conoscenze parziali o inesatte. Ritenendo cruciale questo punto, è stata istituita una giornata dedicata alla conoscenza degli antimicrobici, l'*European Antibiotic Awareness Day*, celebrata per la prima volta il 18 novembre 2008 contemporaneamente in 32 Paesi europei.

Oltre a ciò sono state condotte campagne di sensibilizzazione al problema, sia in Francia che in Belgio, ottenendo discreti risultati in termini di riduzione del consumo degli antimicrobici.

Anche in Italia è stata realizzata una campagna d'informazione, grazie alla collaborazione dell'Agenzia Italiana del Farmaco, dell'Istituto Superiore di Sanità e del Ministero del Lavoro, della Salute e delle Politiche sociali. L'OMS raccomanda inoltre l'attuazione di programmi di addestramento e formazione per il personale sanitario, il quale rappresenta un anello fondamentale nella lotta alle resistenze.

Come emerge da un'indagine del 2005 condotta tra i veterinari clinici dei piccoli animali, la maggior parte di questi percepisce il problema dell'antibiotico-resistenza, ma oltre la metà degli intervistati usa di prassi prescrivere una terapia empirica, facendo ricadere la scelta sui farmaci di ultima generazione [Sala *et al.*, 2006]. Questo tipo di approccio è da evitare, in favore dei saggi di sensibilità: il medico veterinario, infatti, seguendo le raccomandazioni dell'OMS, può prevenire e ridurre le resistenze [Benini, 2011].

I progetti futuri dell'OMS mirano alla definizione di un sistema di monitoraggio dell'antibiotico-resistenza, per ottenere un'istantanea della situazione globale, per poi informare i decisori politici; inoltre vi è la volontà di creare un sistema integrato di sorveglianza tra medicina umana e veterinaria, con programmi specifici per determinate malattie. Gli interventi programmati per il prossimo futuro sono la standardizzazione dell'attività di sorveglianza e la definizione di una piattaforma per l'integrazione dei dati.

Nonostante tutti questi propositi, una vera soluzione al problema dell'antibiotico-resistenza è ancora in fase di studio [Salmaso *et al.*, 2009].

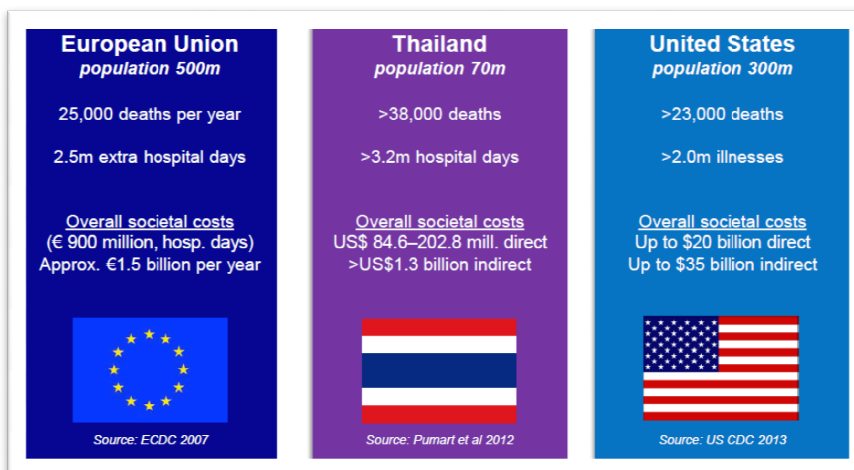
Una possibile svolta sembra essere segnata da una recente ricerca ad opera di un gruppo di studiosi americani: questi ultimi hanno sintetizzato un polimero che blocca l'enzima *Nes*, coinvolto nel trasferimento di plasmidi e, con essi, dei geni della resistenza. La ricerca è stata condotta su alcuni ceppi di *Staphylococcus aureus* con esito positivo

[<http://www.ilfattoquotidiano.it/2013/02/04/antimicrobici-scoperta-molecola-per-combattere-lantibiotico-resistenza/488698/>].

Questo risultato rappresenta un nuovo impulso nella ricerca scientifica e forse, una possibile soluzione ad un problema di grande impatto sanitario.

**Figura 2.1.2**

*L'impatto dell'antibiotico-resistenza: numero di decessi e costi sanitari.*



Fonte: WHO, Global Report on Surveillance, 2014

### 3. L'antibiotico-resistenza in *Salmonella* spp.

L'evoluzione da parte dei microrganismi verso profili di resistenza a farmaci un tempo efficaci, pone non pochi problemi in terapia medica, limitando le opzioni terapeutiche a disposizione del clinico; nel caso della Salmonellosi, l'acquisizione di un maggior grado di virulenza da parte dei batteri, può giocare un ruolo decisivo nell'evoluzione dell'infezione negli animali e nell'uomo [Schito, 1977].

I fenomeni di resistenza agli antimicrobici in ceppi di *Salmonella* spp. crescono di anno in anno [Staffolani *et al.*, 2005]. Molti studi sono stati recentemente condotti in diversi Paesi del mondo per valutarne la dimensione, con particolare attenzione all'emergenza di multiresistenze in ceppi di *Salmonella* spp.: il risultato che ne deriva è l'aumento dell'antibiotico-resistenza e della sua diffusione, collocando il problema tra le priorità in sanità pubblica [Hoelzer *et al.*, 2010].

Ripercorrendo la storia della terapia medica per la cura delle sindromi morbose sostenute da *Salmonella* spp. si evidenzia che vi è stato l'avvicinarsi di trattamenti efficaci, poi risultati vani, seguiti dall'introduzione di nuove molecole, poi rivelatesi inefficaci.

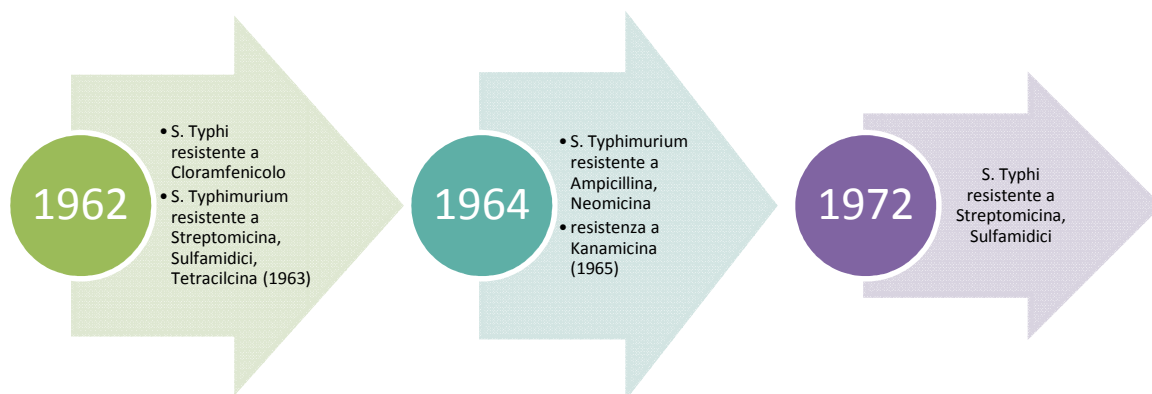
Prima dell'introduzione del cloramfenicolo, nel 1949, la mortalità che facevano registrare le Salmonellosi era alquanto consistente: da quella data in poi, per vent'anni, non è stato necessario saggiare la sensibilità di *S. Typhi* finché nel 1962 si registrarono ceppi resistenti; un'alternativa al cloramfenicolo venne subito rappresentata dall'ampicillina [Romero e Molina, 1967]. Seguirono anni in cui i profili di resistenza erano scarsamente rappresentati finché nel 1972 si verificò una grave epidemia di febbre tifoide in Messico, sostenuta da ceppi resistenti contemporaneamente a cloramfenicolo, streptomina, sulfamidici e tetraciclina [Gangarosa *et al.*, 1972]. Lo stesso ceppo riscontrato in Messico, venne isolato in Inghilterra e negli Stati Uniti nello stesso anno e, nel 1973, in Vietnam, con profilo di resistenza uguale al ceppo messicano [Butler *et al.*, 1973].

Il problema dell'antibiotico-resistenza in *Salmonella* aveva dunque raggiunto diffusione mondiale ma, ancora più rapida, si rivelò poi la diffusione delle resistenze nelle cosiddette "salmonelle minori" [Schito, 1977]. Nel 1962 si isolarono i primi ceppi di *S. Typhimurium* multiresistenti; all'insensibilità alla streptomina e ai sulfamidici, si aggiunse un anno più tardi, la resistenza alla tetraciclina e, due anni dopo, quella all'ampicillina fino alla neomicina e kanamicina nel 1965 [Anderson, 1966].

Oltre a *S. Typhimurium*, cominciavano a far registrare resistenze anche *S. Panama*, *S. Dublin*, *S. Wien*, ma il primato della resistenza restava al sierotipo *Typhimurium*, col oltre l'80% di ceppi multiresistenti (a cloramfenicolo, ampicillina, kanamicina, neomicina, tetraciclina, sulfamidici, streptomina).

**Figura 3.1**

*L'emergenza delle resistenze: il caso di S. Typhi e S. Typhimurium.*



Diversi pareri scientifici erano concordi nel ritenere tale fenomeno collegato all'utilizzo di trattamenti antimicrobici a basse dosi, come promotori di crescita negli animali; l'esposizione ai farmaci aumentava dunque la selezione di cloni resistenti. Data la rarità con cui il genoma batterico muta (una mutazione ogni  $10^3$ -  $10^6$  generazioni), il fenomeno della multiresistenza doveva essere operato da un altro meccanismo ancora: la spiegazione risiedeva nell'acquisizione di geni codificanti per fattori di resistenza, mediata da plasmidi. Il numero di tali geni all'interno dei plasmidi è variabile, ma comprende uno spettro di resistenza che include tutti gli antimicrobici noti [Schito, 1977]. È stato stabilito che i plasmidi R pre-esistevano all'introduzione degli antimicrobici: tuttavia, la pressione selettiva esercitata dagli stessi sia in campo umano che in veterinaria, ha rappresentato motivo di accelerazione del fenomeno; ciò ha particolare rilevanza per le salmonelle, il cui *reservoir* è costituito dagli animali [Schito, 1977]. Le ricerche condotte da Anderson (1968) hanno dimostrato che l'evoluzione della multiresistenza di *S. Typhimurium* è avvenuta nell'intestino di vitelli, per coniugazione con ceppi batterici che presentavano i plasmidi di resistenza, sotto la pressione esercitata dalle terapie con antimicrobici come promotori di crescita. L'analisi retrospettiva consente di affermare che il fenomeno della multiresistenza si verifica anche grazie alla selezione operata dagli antimicrobici, in cui viene favorita la sopravvivenza di ceppi muniti di fattori R di resistenza ricevendo poi, dalla flora commensale refrattaria, altri elementi genici conferenti resistenze.

Le salmonelle antimicrobicoresistenti sono dunque comunemente e frequentemente riscontrate e negli ultimi anni si è verificato, in particolar modo, l'incremento dei ceppi multiresistenti: nel 2000, il 35,2% dei ceppi di *Salmonella* non tifoidi isolati nel continente europeo era resistente ad almeno un farmaco; cinque anni più tardi la percentuale è salita al 40,8% [Threlfall *et al.*, 2003].

Il dato più preoccupante è l'aumento delle resistenze, dal 10,9% al 15,2%, a quattro o più antimicrobici, negli stessi anni [Gill *et al.*, 2005].

I profili di antibiotico-resistenza variano tra sierotipi all'interno del genere *Salmonella*: il sierotipo che in assoluto fa registrare i più alti tassi di resistenze è *S. Enteritidis*, seguito da *S. Typhimurium* - i due *serovar* sono anche quelli maggiormente diffusi nell'uomo e negli animali - . In particolare, un sierotipo che desta preoccupazione, per la sua patogenicità ed i profili di resistenza, è *S. Typhimurium* DT 104: quest'ultimo è stato l'agente causale di numerosi focolai nell'ultimo decennio risultando, nella maggior parte dei casi, multi resistente; nel trattamento erano inefficaci ampicillina, cloramfenicolo, streptomina, sulfamidici e tetracicline contemporaneamente. Gli studi molecolari condotti sul batterio *S. Typhimurium* DT 104 hanno evidenziato che i geni responsabili della resistenza sono localizzati a livello cromosomico (6-8 di DT104) [Glynn *et al.*, 1998; Threlfall *et al.*, 1994]. L'integrazione dei geni della resistenza all'interno dei cromosomi ne consente la trasmissione verticale, anche in assenza della pressione selettiva, fattore scatenante delle resistenze [Staffolani *et al.*, 2005]. Alcuni ceppi invece, come fatto emergere da altre ricerche, sono risultati resistenti a trimetoprim e ciprofloxacina, grazie a meccanismi mediati da plasmidi [Poppe *et al.*,1998]. Un altro caso preoccupante, nuovamente per i criteri di patogenicità e multiresistenza, è quello di *S. enterica* ser. 4,[5],12:i:- . Questo sierotipo si è rapidamente diffuso in vari Paesi del mondo, facendo registrare resistenze multiple a sulfamidici, tetracicline, streptomina ed ampicillina. In Italia, il 75% dei ceppi isolati nel 2009 aveva questo profilo di resistenza. Sebbene queste percentuali possano trovare spiegazione nella pressione selettiva esercitata sui batteri dall'impiego di lunga data di questi principi attivi, sia in veterinaria che in umana, i rilievi allarmanti sono quelli relativi alle resistenze fatte registrare da molecole di più recente introduzione, come i chinoloni [ECDC, 2011].

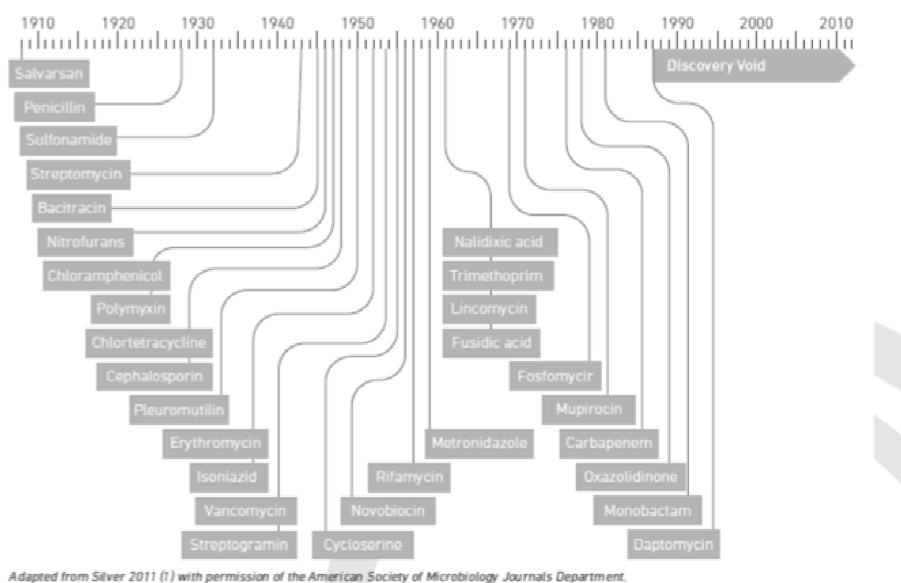
#### 4. Il caso dei chinoloni.

I chinoloni sono una famiglia di sostanze ad attività antimicrobica: costituiscono una classe eterogenea di farmaci derivanti dal 7-clorochinolina. Il capostipite è rappresentato dall'acido nalidixico, sintetizzato nel 1962; esso fa parte dei cosiddetti "chinoloni di prima generazione", assieme a flumechina e agli acidi oxolinico, pipemidico, piromidico.

A questi è seguita la sintesi dei "chinoloni di seconda generazione" o fluorurati: sintetizzati a partire dagli anni '70, essi si caratterizzano per la presenza di un atomo di fluoro in posizione sei, che gli conferisce un ampio spettro d'azione: appartengono a questa famiglia norfloxacin, enrofloxacin, ofloxacin, ciprofloxacin, marbofloxacin.

**Figura 4.1**

*Date di scoperta delle diverse classi di antibiotici.*



Fonte: WHO, Global Report on Surveillance, 2014

Secondo l'EMA (*European Agency for the Evaluation of Medical Products*) i chinoloni e i fluorchinoloni sono tra i farmaci più impiegati, sia in terapia umana sia in veterinaria.

In particolare, i fluorchinoloni, assieme alle cefalosporine di terza generazione, sono gli antimicrobici d'elezione per la terapia di gravi infezioni sostenute da *Salmonella* spp. nell'uomo [Wright *et al.*, 2005]. L'emergenza di resistenze nei confronti di questi farmaci di critica importanza rappresenta un motivo di allarme: negli ultimi decenni le resistenze verso questi ed altri antimicrobici sono notevolmente aumentate [CDC, Annual Report 2009].

Chinoloni e fluorchinoloni sono composti di natura acida, poco idrosolubili e variabilmente liposolubili. L'azione è di tipo battericida: il meccanismo sotteso è l'inibizione della DNA girasi, un enzima che catalizza per la compattazione del DNA batterico su un nucleo di RNA e che ne mantiene la normale struttura spiralizzata. I chinoloni bloccano la DNA girasi inserendosi sulla subunità A e, in tal modo, si legano al DNA costituendo un complesso chinolone-girasi-DNA; questo comporta l'alterazione della normale topografia del genoma e conseguentemente l'inibizione di trascrizione e replicazione, esitando nella morte del batterio. I microrganismi resistenti presentano una "DNA-girasi modificata": la maggior parte delle mutazioni è di origine cromosomica, localizzata in particolari regioni dette QRDR (*Quinolone Resistance Determining Regions*) in particolare nelle sequenze di geni codificanti per le rispettive subunità (*gyrA*, *gyrB*, *parC* e *parE*). Oltre ad esse, i batteri possono presentare mutazioni che provocano un'alterata sintesi delle proteine di membrana, riducendo la possibilità per l'antimicrobico di penetrarvi. Questo tipo di resistenza è spesso crociata con gli antimicrobici beta-lattamici, che utilizzano i medesimi pori per entrare nella cellula. Oltre ai fattori intrinseci posseduti dai batteri, vi sono anche altre spiegazioni per la resistenza, una tra tutte l'utilizzo improprio.

Il primo utilizzo dei chinoloni, in medicina umana, risale al 1962, con l'introduzione dell'acido nalidixico mentre 20 anni più tardi è stata immessa sul mercato la ciprofloxacina, attualmente il chinolone più impiegato in terapia medica [Paton and Reeves, 1988]. Negli stessi anni si verifica il primo utilizzo dei chinoloni in veterinaria, con l'impiego di molecole quali l'acido oxalinico, mentre nei primi anni '90 viene introdotta l'enrofloxacina [EMA, 2007]. La resistenza a quest'ultimo farmaco da parte delle *Enterobacteriaceae* si fa risalire proprio all'utilizzo che ne ha visto fare in quegli anni in zootecnia [Endtz *et al.*, 1991].

Altro meccanismo responsabile della resistenza è la presenza a livello plasmidico dei geni PMQR (*Plasmid Mediated Quinolone Resistance*): la scoperta risale al 1998 con l'identificazione del primo gene *qnr* in un plasmide di *K. pneumoniae* [Martinez, 1998]. I geni *qnr* (A, B, C, D, S e le loro varianti) codificano per delle proteine della famiglia PPR: queste mascherano la DNA girasi, sito *target* dei chinoloni, rendendoli scarsamente efficaci. Da allora sono stati identificati altri geni responsabili delle resistenze: sono di recente scoperta le varianti dei geni *qepA* e *oqxAB* localizzate a livello plasmidico, che codificano per le pompe di efflusso, riducendo la penetrabilità del farmaco nel batterio.

Gli isolamenti di ceppi resistenti ai chinoloni sono numerosi: si cita la resistenza ai fluorchinoloni da parte di *S. Choleraesuis* isolata da suini nel 2001 e quella fatta registrare da *S. Typhimurium* in gatti e bovini. Da *S. Typhimurium* fagotipo DT 104 e *S. Thompson* sono state rilevate mutazioni nelle regioni determinanti la resistenza ai chinoloni, in particolare la mutazione in *qnrS1* [Ahmed *et al.*, 2009; Hopkins *et al.*, 2007].

- **Il cane come serbatoio per la Salmonellosi umana.**

## **5. Il rapporto cane - uomo: rischi e benefici.**

Il rapporto intercorrente tra uomo e animali ha vari aspetti: la sua complessità è dovuta ai risvolti psico-sociali, economici e sanitari che presenta [Ballarini, 1983]. La domesticazione del *Canis lupus familiaris* si fa risalire ad almeno 33.000 anni fa, in seguito ad un processo iniziato ben più lontano nel tempo [Druzhova, 2013]. Inizialmente il cane rappresentava una fonte di collaborazione per l'uomo, ne difendeva il territorio e, con esso, i beni che ne facevano parte. Nei secoli, tale convivenza si è evoluta ed ha cambiato radicalmente aspetto. In tempi recenti si è difatti assistito alla modificazione del rapporto uomo-animale: il cane viene sempre più spesso "umanizzato", il che porta all'aumento di comportamenti che espongono chi li attua, ai rischi che ne derivano, come quello di contrarre zoonosi [Wieler, 2012].

Questo modo di relazionarsi, che comprende ad esempio baciare l'animale, farlo partecipare ai propri pasti, è tipicamente una prerogativa dei bambini, i quali sono tra i soggetti maggiormente a rischio di contrarre malattie, per l'imaturità del sistema immunitario [Farina, 1984]. Si valuta, oltre alla trasmissione tra animale ed uomo di agenti patogeni in sé, il fatto che questi ultimi, sotto la pressione selettiva esercitata dai farmaci, hanno acquisito profili di antibiotico-resistenza. Ciò che preoccupa, pertanto, è che possano essere veicolati, tra cane e uomo, batteri che evocano malattie difficilmente trattabili con i farmaci attualmente disponibili. Negli ultimi trent'anni, infatti, non sono state sintetizzate nuove classi di antimicrobici mentre i farmaci esistenti risultano essere sempre più inefficaci, vittime di un fenomeno che ha raggiunto proporzioni mondiali. Per quanto concerne *Salmonella* spp. le occasioni di contagio per l'uomo sono sensibilmente aumentate, per via dell'inserimento nella catena epidemiologica, di nuovi anelli di trasmissione: oltre agli alimenti, veicolo più frequente ma anche più frequentemente indagato, vi sono gli animali d'affezione e quelli non convenzionali, di recente diffusione [Farina, 1983]. Il ruolo del cane non è da trascurare, vista la popolarità che ha tra gli animali da compagnia: secondo i dati Eurispes aggiornati al 2011, oltre dieci milioni di italiani hanno uno o più cani ospitati presso le proprie famiglie, per un totale di sette milioni di cani di proprietà [<http://eurispes.eu/content/animali-domestici-quasi-il-42-degli-italiani-ne-possiede-uno>].

A questi, si devono sommare gli oltre cinquecentomila cani vaganti, randagi o inselvaticiti, stima che probabilmente è da ritenersi in difetto. La presenza di *Salmonella* è stata comprovata in cani di tutti i continenti, soprattutto in soggetti giovani, sia randagi sia di proprietà: per i cani che vivono nelle abitazioni, secondo il parere di Farina (1983), sono state rilevate percentuali elevate, fino al 30% di positività [Cobb e Stavisky, 2013]. L'incremento della popolazione canina nelle aree

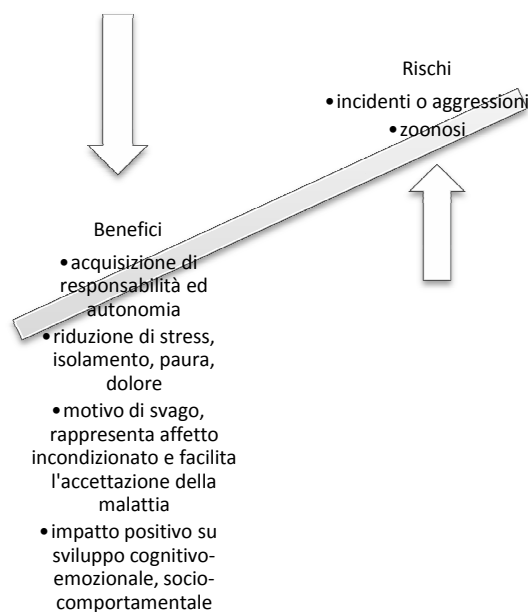


urbane porta con sé problemi di igiene pubblica, come quello relativo dalla fecalizzazione ambientale. La rilevanza che esso riveste è dovuta al possibile contatto tra uomo e feci del cane, specialmente in luoghi come parchi pubblici e giardini [Farina, 1983].

Tuttavia, la coesistenza uomo-animale è desiderabile nella civiltà moderna, per il ruolo indiscutibile di cui quest'ultimo gode, ed i giovamenti che se ne traggono in qualità di risorsa sociale: basti pensare agli interventi assistiti con gli animali, ai cani guida per le persone non vedenti, a quelli impiegati nella ricerca di persone, nelle attività anti-droga, di salvataggio sulle spiagge, oltre alla figura che ricopre all'interno di un nucleo familiare. Se rispettata la legislazione, suffragata da una corretta educazione dei cittadini, con un'adeguata gestione ambientale ed i necessari controlli sanitari delle popolazioni animali presenti, la convivenza tra uomo ed animale offre innumerevoli benefici a favore di tutti [Mantovani, 1983].

### **Grafico 5.1**

*Il rapporto rischi e benefici nella relazione tra bambini immunodepressi e animali.*



## 6. Il ruolo del cane nella trasmissione di *Salmonella* spp.

L'infezione sostenuta da *Salmonella* spp. si verifica secondo le modalità più disparate ma, di norma, riconosce origine alimentare; questo aspetto è stato largamente indagato, portando a definire piani di sorveglianza e controllo come quelli adottati per le ovaiole, i polli da ingrasso e da riproduzione, i tacchini, i suini.

Il ruolo degli animali da compagnia nella trasmissione del batterio è sicuramente meno esplorato: sono stati condotti studi volti a comprendere la dimensione del fenomeno nel cane e nel gatto, ma anche in animali d'affezione non convenzionali, come i pesci d'acquario, gli uccelli ornamentali e i rettili *pet* [Herris *et al.*, 2009; Corrente *et al.*, 2006; Sanchez *et al.*, 2002; Orosz, 1957].

I risultati emersi da queste ricerche hanno portato a un esito concorde: rettili, pesci ed uccelli sono considerati fonte d'infezione da *Salmonella* spp., alla stregua degli alimenti.

Secondo una ricerca condotta da Grant e Olsen nel Wisconsin, gli oltre cinquecento veterinari intervistati ritengono che gli animali più "pericolosi" siano i rettili e i cuccioli di cane, poiché portatori asintomatici; difatti si ritiene che lo sia oltre il 90% dei rettili *pet*, evidenziando in essi il *reservoir* di più sierotipi, mentre le stime dei portatori asintomatici nel cane si aggirano al 36% [Corrente *et al.*, 2006; Sanchez *et al.*, 2002; Grant e Olsen, 1999]. Tra il 2007 ed il 2008 in diversi stati degli USA si sono registrati focolai di salmonellosi in pazienti pediatrici, accertati derivanti dall'esposizione a tartarughine d'acqua [Herris *et al.*, 2009]. Inoltre, uno studio condotto da ricercatori australiani nel 2006 ha evidenziato negli acquari contenenti pesci ornamentali tropicali il *reservoir* di *Salmonella* Paratiphy B, responsabile di gastroenterite, specialmente nei bambini. Nel 1990 negli Stati Uniti sono stati isolati ceppi di *Salmonella* Enteritidis fagotipo 4 da pappagalli [Orosz, 1957]. B.R. Madewell e A. E. McChesney riportano un caso di salmonellosi in un bambino, un gatto e due pappagalli nello stesso ambiente domestico [Madewell e McChesney, 1975].

Lo stato di portatore di *Salmonella* spp. è stato accertato sia nel cane che nel gatto, anche se in misura maggiore nel primo: in particolare il cane è stato riconosciuto serbatoio di oltre 50 diversi sierotipi di salmonelle e, in diversi casi, è stata riscontrata la presenza contemporanea anche di due o più di essi. Indagini svolte da autori nordamericani e giapponesi hanno rilevato la presenza di *Salmonella* Typhimurium in cani naturalmente eliminatori, in quantità di germi pari a 800 - 30.000 per grammo di feci [Farina, 1983]; per l'infezione sperimentale esitante nello stato di portatore, erano sufficienti 39 - 92 microrganismi provenienti da feci di cani infetti [Farina, 1983]. Una volta infetto, il cane elimina in modo intermittente il patogeno, per una durata che può variare. Secondo Tanaka e colleghi (1976), l'eliminazione di *S. Typhimurium* da parte di cani infettati sperimentalmente, raggiunge il mese di durata; altri dati in merito sono forniti da Day che nel 1963, assieme ad altri Autori, ha evidenziato 117 giorni di eliminazione post-infezione

sperimentale mentre, in condizioni naturali, lo stesso sierotipo è eliminato per un arco di tempo tra 60 e 90 giorni. La maggior parte delle volte, l'infezione nel cane decorre in assenza di sintomatologia clinica, o comunque in forme più blande rispetto a quelle che colpiscono, ad esempio, gli erbivori [USAV, Salmonellosi, 2014]. Questa peculiarità si può ipotizzare che sia da riferire al comportamento di *Salmonella* che evoca la malattia, oltre che per fattori genetici legati alla patogenicità, anche in relazione alle condizioni dell'ospite. Sono dovute a queste criticità (condizione di serbatoio di più *serovar* ed eliminazione prolungata ed intermittente in assenza di sintomi) le segnalazioni in bibliografia di diversi casi di trasmissione di *Salmonella* spp. tra cane e uomo, in particolare tra i bambini [Sato *et al.*, 2000; Morse *et al.*, 1976; Reynolds 1974].

Sono riportati casi di malattia veicolati dal cane all'uomo fin dal 1937: si cita il focolaio descritto da Reynolds, in cui tre bambini, tre madri, sei cani e tre gatti erano risultati positivi a *S. Typhimurium* fagotipo 3, originato dalla carne di pollo con cui erano stati alimentati gli animali. Questo è un esempio del tipico pattern di trasmissione della salmonellosi: cibo contaminato destinato al cane, infezione dell'animale e contagio per l'uomo [Reynolds, 1974]. Altri casi simili riportati in bibliografia sono l'isolamento di *Salmonella* Virchow in un bambino, trasmessa dai suoi cani alimentati con cibo commerciale e carne di pollo [Sato *et al.*, 2000]; ed ancora, l'epidemia sostenuta da *Salmonella* Schwarzengrund nell'uomo in diciannove stati americani causata dalla manipolazione di cibo commerciale per cani [CDC, 2008]. La più recente notizia a riguardo risale a giugno 2014, data in cui è stata effettuata la procedura di ritiro da parte della società Hill's Pet Nutrition di 64 confezioni di cibo secco per cani, contaminato da *Salmonella* spp.. Un altro caso di trasmissione del batterio tra cane e uomo è quello riferito negli anni 1999 e 2000, negli Stati Uniti, dove sono scoppiati quattro focolai dovuti a *Salmonella enterica* ser. Typhimurium: l'infezione ha coinvolto gli impiegati di una clinica veterinaria, i clienti, gli animali dei clienti per un totale di oltre 45 soggetti ammalati; i focolai, uno dei quali sostenuto da un ceppo multiresistente, sono originati da tre portatori asintomatici ed un eliminatore [Wright *et al.*, 2005]. Gli Autori concludono che tale diffusione dimostra che gli animali da compagnia possono fungere da *foci* di trasmissione per *Salmonella* tra animali ed uomo, se non vengono prese le adeguate precauzioni.

Le modalità di esposizione al batterio sono dunque le più disparate: la presenza del patogeno nelle feci e nella saliva del cane, oggetti che sono entrati a contatto con le feci dell'animale affetto anche grazie a vettori biologici come le mosche, il contatto, durante le attività di giardinaggio, col terreno dove l'animale ha defecato, il maneggiare *petfood* contaminati. Un altro comportamento attuato dal cane, che espone l'uomo al rischio d'infezione, è rappresentato dal *social grooming*, un etogramma atto a rafforzare il legame con i proprietari, verso cui tale *pattern* è diretto. Se il *grooming* avviene, ad esempio, su ferite esposte, queste possono essere

contaminate da batteri presenti nella saliva dell'animale e che, tramite il circolo ematico, vengono diffusi nell'organismo. Si ritiene che nel cavo orale del cane vi siano diversi batteri patogeni, tra questi *Salmonella* spp. e *Pasteurella multocida*.

Per contenere il rischio, è bene seguire delle norme che possono essere suggerite dal medico veterinario il quale è fondamentale per l'educazione responsabile dei proprietari, in merito alla tutela della salute dell'uomo e degli animali, come prescritto dal codice deontologico. Le raccomandazioni, specialmente per tutelare i bambini e gli immunocompromessi sono quelle di evitare il contatto con le feci dell'animale. A tal fine è importante: non lasciare giocare il bambino a terra dove è probabile il contatto con deiezioni, rimuovere le deiezioni dal giardino o dall'area frequentata da cani e bambini, pulire accuratamente i pavimenti, far lavare le mani al bambino dopo il contatto con l'animale, non lasciar leccare dall'animale il volto o le ferite, assicurarsi della salute del proprio animale, con periodici *screening* per gli agenti zoonotici enterici, eseguire la regolare pulizia dell'animale che va tenuto al guinzaglio durante le passeggiate anche per poter controllare gli spazi che esplora, facendo cura all'alimentazione dello stesso, che deve essere a base di prodotti di buona qualità e provenienza commerciale nota, evitando la somministrazione di uova e carne crudi.

## **Salmonella spp.**

### **7. Il genere Salmonella.**

I batteri appartenenti al genere *Salmonella* devono il loro nome al veterinario Daniel Elmer Salmon: nel 1885 il patologo americano era a capo di un gruppo di ricerca, all'interno del Dipartimento di Agricoltura degli Stati Uniti (USDA), che avrebbe portato all'isolamento del microrganismo poi ascrivito a suo nome; a contribuire a questa scoperta è stato Theobald Smith, batteriologo statunitense che prese parte al progetto, il quale isolò dall'intestino del suino il bacillo, poi denominato *Salmonella choleraesuis*.

Alla collaborazione tra Salmon e Smith seguirono le successive acquisizioni apportate dalle ricerche svolte da Pierre-Charles Alexandre Louis, William Jenner e Georg Theodor August Gaffky: le indagini di questi studiosi, Salmon *in primis*, hanno segnato un fruttuoso capitolo nella nascente sezione dei Servizi Veterinari americani [Sali, 1999].

Tra i conseguimenti ottenuti dagli studi condotti in quegli anni, è da citare la suddivisione tra "salmonelle tifoidee" e "non-tifoidee", che iniziò ad essere definita per la prima volta dal lavoro condotto a Parigi nel 1829 da Louis il quale, basandosi sulle lesioni anatomico-patologiche evocate da *Salmonella* spp., distinse la "febbre tifoide" dalle altre sindromi morbose che verranno poi definite "paratifi" e "salmonellosi minori" [Miller *et al.*, 1995].

Gli studi condotti da Jenner prima e da Gaffky poi, contribuirono a chiarire tale distinzione, con l'isolamento dell'agente eziologico del tifo, quale microrganismo capace di evocare forme di malattia enterica nell'uomo e negli animali.

Si deve al lavoro di Hugo Schottmüller la definizione del "paratifo", una sindrome che aveva delle manifestazioni cliniche simili al tifo addominale, con l'isolamento del *Bacterium paratyphi A* e *Bacterium paratyphi B*.

È attualmente accettata la suddivisione delle malattie sostenute da *Salmonella* spp. in due macrogruppi: il primo, riferito alle forme tifoidee le quali si caratterizzano per avere come serbatoio l'uomo, racchiude la "febbre tifoide" che trova il suo agente eziologico in *Salmonella Typhi*, ed i cosiddetti "paratifi" sostenuti da *Salmonella Paratyphi A* e *Salmonella Paratyphi B*; il secondo macrogruppo è costituito dalle forme non tifoidee anche note come "salmonellosi minori", sostenute dalle "salmonelle zoonotiche" quali ad esempio *Salmonella Typhimurium* (*S. enterica subsp. enterica ser. Typhimurium*) e *Salmonella Enteritidis* (*S. enterica subsp. enterica ser. Enteritidis*), i cui *reservoir* sono rappresentati dall'ambiente, gli animali, i prodotti di origine animale.

### **Tabella 7.1**

*Le forme morbose associate a Salmonella: agente eziologico e reservoir.*

<b>Forme di malattia</b>	<b>Agente eziologico</b>	<b>Reservoir</b>
<b>Forme tifoidee</b> - Febbre Tifoide - Paratifo	- <i>Salmonella typhi</i> - <i>Salmonella paratyphi A</i> <i>Salmonella paratyphi B</i>	Uomo
<b>Forme non tifoidee</b> - Salmonellosi	- "salmonelle minori" - "salmonelle zoonotiche" es. <i>S. Typhimurium</i> <i>S. Enteritidis</i>	animali, ambiente, prodotti di origine animale

## 8. Habitat e diffusione.

*Salmonella* alberga nell'intestino di tutti gli animali, a sangue caldo e a sangue freddo, nonché nell'ambiente, dove sopravvive oltre nove mesi, specialmente in acqua e terreni umidi.

Ha diffusione ubiquitaria, ovvero in substrati diversi di tutto il mondo è possibile rinvenire ceppi di *Salmonella*, alcuni dei quali trovano localizzazione caratteristica in determinate regioni.

Il ciclo biologico di *Salmonella* prevede quindi anche "ospiti ambientali" che fungono da anello tra nicchie ecologiche costituite dagli animali selvatici e quelli domestici: i serbatoi ambientali sono rappresentati da fonti naturali come le acque di scarico, quelle superficiali, laghi, mari, liquami ed altre artificiali come le superfici o gli strumenti [Cirillo *et al.*, 2003].

**Tabella 8.1**

*La classificazione delle specie appartenenti al genere Salmonella:  
sub-specie e habitat.*

Specie	Sub-specie	Habitat
<b><i>Salmonella enterica</i></b>	<i>enterica</i>	Animale a sangue caldo
	<i>salamae</i>	Animali a sangue freddo e ambiente
	<i>arizona</i>	Animali a sangue freddo e ambiente
	<i>diarizonae</i>	Animali a sangue freddo e ambiente
	<i>houtenae</i>	Animali a sangue freddo e ambiente
	<i>indica</i>	Animali a sangue freddo e ambiente
<b><i>Salmonella bongori</i></b>		Animali a sangue freddo e ambiente

Il fatto che dall'ambiente acquoso vengano isolati sierotipi con predominanza diversa rispetto alle specie endemiche nell'uomo e negli animali, presuppone che un pool di salmonelle vivano e si moltiplichino nell'ambiente, da cui solo alcune specie compiano il salto d'ospite, passando poi agli animali o all'uomo [Cirillo *et al.*, 2003].

Molti dei microrganismi ad ecologia enterica hanno come via preferenziale di diffusione quella a lungo raggio, mediata da alimenti ed acqua: *Salmonella* non vi fa eccezione [Nastasi, 2003].

Sebbene, nei Paesi industrializzati, grazie al controllo della fecalizzazione ambientale e alla bonifica delle acque, si è ridotta la prevalenza del batterio in queste sedi, d'altra parte si è affermata la predominanza degli agenti zoonotici quali responsabili della maggior parte delle malattie nell'uomo - il 75% delle malattie infettive umane è sostenuto da questi ultimi - ; nei Paesi in via di sviluppo invece, sono stati condotti studi sulle infezioni enteriche al fine di identificare il modello epidemiologico di infezione, base a partire dalla quale programmare interventi di profilassi e bonifica delle acque [Muresu *et al.*, 2003].

Dal punto di vista epidemiologico si classificano salmonelle adattate ad un ospite specifico e salmonelle non adattate a nessun particolare ospite. Le prime, sembrano rendersi responsabili di

gravi forme cliniche, rispetto a quelle non ospite adattate. Tra queste ultime possiamo annoverare *S. enterica ser. Enteritidis* e *S. enterica ser. Typhimurium*, responsabili di infezione, nell'uomo e negli animali, con varietà di forme cliniche ma generalmente auto-limitanti [Sanderson e Nair,2013].

Un'ulteriore suddivisione all'interno delle salmonelle adattate a ospiti specifici è data dalle salmonelle ad "ospite-ristretto" e quelle "ospite-adattate". Queste ultime sono confinate ad un ristretto numero di ospiti come avviene per *S. Dublin* nei bovini e *S. Choleraesuis* nel suino, che possono però infettare l'uomo ed un numero limitato di altre specie. Le salmonelle ad "ospite-ristretto" sono associate a gravi forme sistemiche in un solo ospite: è il caso di *S. Typhi* e *S. Paratyphi* nell'uomo, *S. Gallinarum* nel pollame ed *S. Abortusovis* nelle pecore [Stevens *et al.*, 2009].

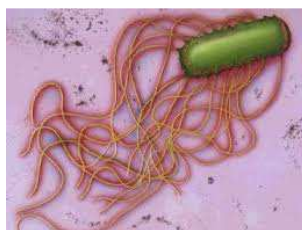


## 9. Caratteristiche fenotipiche

Il genere *Salmonella*, appartenente alla famiglia *Enterobacteriaceae*, raggruppa batteri Gram negativi, di forma bacillare, asporigeni, anaerobi facoltativi, delle dimensioni di 0,7-1,5 x 2,0-5,0 micron, generalmente mobili grazie alla presenza di flagelli peritrichi (fanno eccezione *S. enterica subsp. enterica ser. Gallinarum* e *S. enterica subsp. enterica ser. Pullorum*) [Poli et al., 2005].

**Figura 9.1**

Rappresentazione di *Salmonella* spp.



Fonte: [www.sciencephoto.com](http://www.sciencephoto.com)

Come dimostrato dall'habitat ideale localizzato nell'intestino di tutti gli animali, il batterio ha un *range* di temperatura ottimale di crescita tra 35°C e 37°C ma sopravvive e si moltiplica anche a temperature comprese tra 8°C e 45°C [Zavanella, 2001]. Alcuni ceppi di *Salmonella* sono risultati termoresistenti, ma il profilo prevalente lo vede sensibile al calore, con inattivazione che si verifica a seguito dell'esposizione sopra i 70°C per pochi secondi [Galli, 2005]. Da questo dato emerge come la pasteurizzazione sia un processo efficace per eliminare il batterio [Zavanella, 2001]. Altro parametro ideale di crescita è quello che si aggira tra 6,6 e 8,2 nella scala del pH, ovvero attorno alla neutralità: valori di basicità e acidità uccidono il microrganismo, in particolare sotto 4,0 e sopra 9 [Zavanella, 2001]. In alcune condizioni, come in caso di aerazione, è stata segnalata la crescita del batterio anche sotto i 4,05 pH. Per quanto concerne un altro parametro di inibizione della crescita, si cita la *Water Activity* per valori inferiori a 0,94 in substrati a pH neutro: virando verso l'acidità sono richiesti valori sempre più elevati di *Aw*.

*Salmonella* è sensibile verso le sostanze acide, mentre è resistente al congelamento e all'essiccamento: questo fatto è dovuto alla presenza di sostanze che conferiscono protezione alla cellula batterica, come le proteine [Zavanella, 2001].

Il profilo metabolico prevalente nel genere è riportato in tabella: si citano la capacità di fermentare il glucosio, il maltosio, di produrre H<sub>2</sub>S ( ad eccetto che per *S. enterica subsp. Enterica ser. Choleraesuis* e *S. enterica subsp. enterica ser. Typhi* ) e di ridurre i nitrati.

Esistono però delle variazioni nel profilo metabolico in alcune specie o sub specie [Zavanella, 2001].

**Tabella 9.2***Profilo metabolico prevalente e variazioni in Salmonella spp.*

REAZIONE	Profilo prevalente
Produzione di indolo	-
Produzione di urea	-
Produzione di H <sub>2</sub> S	+
Riduzione dei nitrati	+
Rosso metile (RM)	+
Fermentazione di saccarosio	-
Fermentazione di adonite	-
Fermentazione di maltosio	+
Fermentazione di sorbite	+
Fermentazione di lattosio	-
Fermentazione di Glucosio + gas	+
Fermentazione di Salicina	-
Fermentazione di mannite	+
Fermentazione di inosite	-

REAZIONE	<i>S. enterica</i>						<i>S. bongori</i>
	<i>enterica</i>	<i>salamae</i>	<i>arizonae</i>	<i>diarizonae</i>	<i>houtanae</i>	<i>indica</i>	
Fermentazione di Dulcitate	+	+	-	-	-	+/-	+
Fermentazione di lattosio	-	-	-	+	-	+/-	-
Fermentazione di salicina	-	-	-	-	+	-	-
Fermentazione di malonato	-	+	+	+	-	-	-
Fermentazione di d(+)tartrato	+	-	-	-	-	-	-

I batteri appartenenti al genere *Salmonella* crescono facilmente su terreni sintetici, formando colonie che, per terreni solidi allestiti su piastre Petri, hanno aspetto rotondo, di diametro che si aggira tra i 2 e i 3 millimetri. La crescita avviene facilmente in terreni minimali poiché il batterio non necessita di particolari fattori nutritivi, ad eccezione di *S. Typhi*, *S. Paratyphi A*, *S. Gallinarum*, *S. Abortusovis*.

Questo si rileva anche nella sua lunga permanenza ambientale, che può perdurare anche per mesi in terreni umidi, acque, liquami; per quanto riguarda la resistenza negli alimenti, questa è maggiore per il latte e latticini, sulle verdure e le carni insaccate [Zavanella, 2001].

## 9.1 La struttura antigenica.

La struttura antigenica del batterio è costituita da tre componenti, gli antigeni somatici O, quelli capsulari Vi ed i flagellari H.

Gli antigeni somatici sono specifici della superficie della cellula: a questo livello il batterio è contornato da una membrana esterna costituita da una trama lipopolisaccaridica a cui è da imputare la tossicità. L'antigene somatico O è costituito da una parte esterna, rappresentata da catene saccaridiche, mentre la parte interna comune tra i Gram negativi, è un *core* di cinque carboidrati. La composizione degli zuccheri presenti, i legami che ne intercorrono e la loro sequenza, determina una variabilità tra gli antigeni O, che si caratterizzano per essere la parte più mutevole della superficie cellulare. Le formule antigeniche, caratteristiche per diversi sierotipi, sono indicate con numeri arabi: ad oggi, sono stati segnalati 67 antigeni O. Questi vanno a costituire dei raggruppamenti all'interno di sierotipi: si tratta di gruppi sierologici per analogia di antigeni O e vengono indicati con le lettere A, B, C ecc. .

L'antigene capsulare Vi in *Salmonella* corrisponde al K presente negli altri enterobatteri. Vi è un antigene termolabile che può essere presente in alcune Salmonelle, le quali acquisiscono, tramite questo, profili di maggior virulenza: ne sono degli esempi *S. Typhi*, *Paratyphi* e *Dublin*. La maggior virulenza è dovuta al fatto che l'antigene capsulare va a mascherare quello somatico, non rendendolo più visibile al sistema immunitario, ai sieri somatici. E' possibile la perdita della agglutinabilità, secondo la mutazione  $V \leftrightarrow W$ .

L'antigene flagellare H, anche noto come ciliare, è posseduto dalle specie mobili di *Salmonella*, che sono la maggior parte nel genere: fanno eccezione *S. Gallinarum* e *S. Pullorum*. Esistono due fasi in cui si possono presentare gli antigeni flagellari: una, la fase uno, specifica per quel sierotipo, e la fase due, non caratteristica ma comune a più sierotipi. Attualmente si conoscono 83 antigeni di fase 1, indicati con lettere minuscole dell'alfabeto fino al ventiseiesimo, mentre i successivi sono indicati con zeta numerata progressivamente. Sono noti undici antigeni di fase due, indicati con numero arabo. Gli antigeni flagellari sono di natura proteica, termolabili, e possono essere presenti contemporaneamente, fase uno e fase due, ma alcuni sierotipi sono caratteristicamente monofasici, come *S. Enteritidis* la cui struttura antigenica è 1,9,12 : g, m: -.

In seguito a rari fenomeni di mutazione, le salmonelle possono perdere la struttura antigenica H, divenendo dunque prive di mobilità: tale mutazione è indicata con  $HO \leftrightarrow O$ .

In base alla struttura antigenica ogni ceppo può essere caratterizzato: secondo lo schema di Kauffmann-White i sierotipi vengono descritti da una formula suddivisa in tre parti, separate dal segno " : ", rappresentanti nell'ordine l'antigene somatico O e gli antigeni H di fase 1 e 2. Nell'elenco sottostante sono riportati degli esempi.

**Tabella 9.1.1**

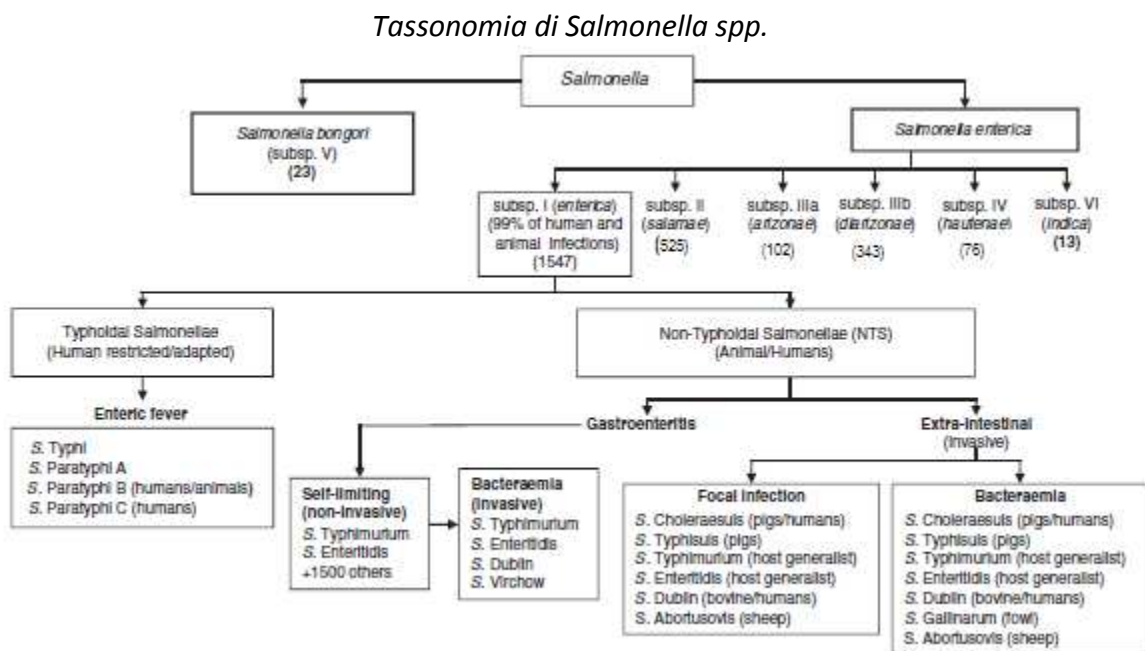
*Formule antigeniche dei ceppi isolati in questo studio.*

<i>Formule antigeniche complete</i>	S. Napoli – Gr. D1 – 1,9,12 : l,z13 : e,n,x S. Veneziana – Gr. F – 11 : i : e,n,x S. Bredeney - Gr.B - 1,4,12,27 : l,v : 1,7 S. Typhimurium monofasica
<i>Gruppo sierologico ; Antigene O ; Antigene H di fase 1 ; Antigene H di fase 2</i>	

## 10. Classificazione.

I batteri sono classificati seguendo il sistema ideato da Carlo Linneo, ovvero la nomenclatura binomiale: si scrive in latino il genere, con lettera maiuscola, seguito dalla specie in minuscolo. All'interno del genere sono raggruppate specie accumulate da caratteristiche biochimiche e colturali; nella specie, unità base in microbiologia, si trovano ceppi che condividono le medesime caratteristiche fenotipiche. All'interno del ceppo, cloni che presentano lo stesso profilo sono raggruppati in sottospecie, simili per sierotipo, fagotipo o patotipo [Poli *et al.*, 2005].

**Schema 10.1**



Adattato da: *Salmonella in Domestic Animals*, Sanderson e Nair, 2013

Come ricordato in precedenza, una prima classificazione del genere *Salmonella* fu eseguita sulla base delle forme morbose che evocavano i microrganismi ad esso appartenenti, con la delineazione delle cosiddette “salmonelle tifoidi”, “paratifoidi” e le “salmonelle minori”.

I successivi aggiornamenti nel sistema di classificazione si devono all'attività di White e Kauffmann che, nella prima metà del '900, catalogarono il genere *Salmonella* in sierotipi, in base agli antigeni somatico (O), flagellare (H), capsulare (Vi).

Si deve all'attività di Le Minor lo schema utilizzato per la nomenclatura del genere, che viene suddiviso in due specie: *S. enterica* ed *S. bongori*. La prima è ulteriormente suddivisa in sei sottospecie, *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houteanae*, *indica*.

La classificazione tassonomica oggi in uso è proprio quella messa a punto da questi studiosi, nota come schema di Kauffmann-White-Le Minor, aggiornato con cadenza annuale da parte del *Collaborating Center for Reference and Research on Salmonella*, centro di lavoro dell'Organizzazione Mondiale della Sanità. Gli aggiornamenti prevedono la pubblicazione dei sierotipi di nuovo isolamento all'interno del *Journal Research in Microbiology*.

La prima pubblicazione dello schema di Kauffmann-White risale al 1934, epoca in cui si annoverano 44 sierotipi ma, già trent'anni dopo, lo schema conta 958 sierotipi; grazie alla successiva produzione scientifica ad opera di L. Le Minor prima e M. Y. Popoff dopo, si raggiunge quota 2.555 sierotipi validati.

I più recenti aggiornamenti sono riportati nella pubblicazione datata settembre 2014, sul *Journal Research in Microbiology*: sono descritti 63 nuovi sierotipi e 25 nuove varianti dei sierotipi già conosciuti, relativi all'attività del *WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella* tra il 2008 e il 2010. Sono stati aggiunti 44 nuovi sierotipi a *Salmonella enterica* subspecie *enterica*, 12 alla subspecie *salamae*, 2 alla subspecie *arizonae*, 2 a *diarizonae* e 3 per la subspecie *houtenae* [Issenhuth-Jeanjea, 2014].

**Tabella 10.2**

*Aggiornamenti dei sierotipi di Salmonella identificati dal "WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella" tra il 2008 e il 2010.*

Famiglia Enterobacteriaceae			
Specie	Sub-specie	N° sierotipi già noti	N° sierotipi aggiunti
<b><i>S. enterica</i></b>	<i>enterica</i>	1547	44
	<i>salamae</i>	513	12
	<i>arizonae</i>	100	2
	<i>diarizonae</i>	341	2
	<i>houtenae</i>	73	3
	<i>indica</i>	13	-
<b><i>S. bongori</i></b>		23	-
	<b>Totale</b>	2610	63
<b>Totale a settembre 2014</b>			2673

## 11. La genetica del microrganismo: i plasmidi, un genoma extra-cellulare.

Tutte le proprietà dei batteri, incluse la patogenicità e l'antibiotico-resistenza, sono determinate a livello genetico [Poli *et al.*, 2005]. Il genoma dei batteri è relativamente semplice rispetto ad organismi superiori, ma con essi, condividono le componenti essenziali, come gli acidi nucleici, sebbene con caratteristiche differenti. I batteri hanno un codice genetico di piccole dimensioni, un solo cromosoma circolare, localizzato direttamente nel citoplasma della cellula. Il genoma è costituito da un unico corredo cromosomico, in forma aploide, spiralizzato attorno al *core* di RNA. Oltre a questo tipo di materiale genetico, i batteri possiedono anche un genoma extra-cellulare, i plasmidi.

Questi ultimi sono strutture geniche che contengono materiale ereditario extracromosomico, presenti nel citoplasma di molti batteri. L'importanza di questi anelli di geni risiede nel fatto che possono essere trasferiti tra microrganismi, con il fenomeno della coniugazione: esso avviene grazie alla presenza di *sex-pilus* che formano un ponte tra cellula donatrice e ricevente.

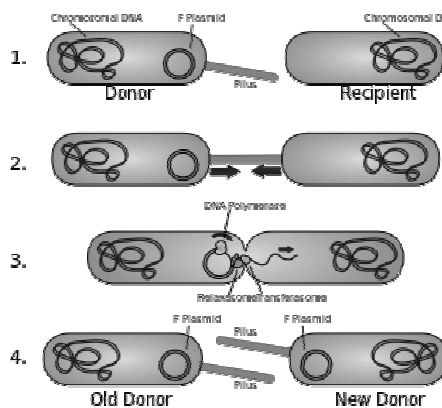
Il possesso di *sex-pilus*, oltre ai pili comuni, è determinato da plasmidi denominati "fattori F" o di fertilità liberi nel citoplasma o integrati nel cromosoma, in questo caso definito episoma. Durante il trasferimento di plasmidi F tra batteri donatori e riceventi che ne sono sprovvisti, si ritiene avvenga la rottura dell'elica circolare di DNA plasmidico, con formazione di un'estremità libera, che può passare alla cellula ricevente. In questa fase avviene anche la replicazione del DNA plasmidico, il quale è in grado di svolgere questo processo autonomamente, indipendentemente dal DNA genomico della cellula; così risultano in possesso di una copia di materiale plasmidico sia il donatore che il ricevente. Quest'ultimo acquisisce pertanto la capacità di divenire a sua volta donatore: questo meccanismo permette la facile diffusione di materiale genetico tra i batteri [[http://qs1439.pair.com/michaelz/repository/microbiologia/modulo\\_0/unit\\_3/sco\\_3/text.html](http://qs1439.pair.com/michaelz/repository/microbiologia/modulo_0/unit_3/sco_3/text.html)]. La rilevanza del fenomeno risiede nel fatto che il materiale veicolato può avere funzioni diverse, come il conferimento dell'antibiotico-resistenza, oggetto di questo studio.

## 11.1 I plasmidi R.

I plasmidi sono elementi genetici extracromosomici, sotto forma di un'unica molecola di DNA circolare a doppia elica; i plasmidi che conferiscono antibiotico-resistenza sono definiti plasmidi R. La loro scoperta, risalente alla metà del Novecento, ha tenuto impegnati i genetisti del mondo scientifico, vista la rilevanza delle caratteristiche che andavano a conferire alla cellula batterica [Watanabe, 1963]. Essi prendono nome dal fattore R responsabile della resistenza: quest'ultimo contiene un'origine di replicazione (ori) e i geni dell'antibiotico-resistenza (elementi R), oltre all'attitudine della coniugazione (*Transfer Factor TF*) per la formazione del *sex pilus*. Tali plasmidi sono stati riscontrati sia in batteri commensali sia in altri patogeni, con l'esito comune di conferimento della refrattarietà agli insulti farmacologici operati da sulfamidici, tetraciclina, cloramfenicolo, streptomina, penicilline, kanamicina oggetto di questo studio, ma anche nei confronti di altri chemioterapici. L'antibiotico-resistenza indotta dal fattore R può essere singola o multipla: la pericolosità del trasferimento dei fattori che la determinano è data dal fatto che lo scambio dei cosiddetti "plasmidi promiscui" può avvenire tra generi e specie diversi, da batteri innocui commensali, ad altri patogeni [Carattoli, 2009]. Inoltre, il profilo di resistenza sarà influenzato dal numero di copie del plasmide posseduto dalla cellula batterica: più sono le copie possedute del plasmide, maggiore sarà la resistenza agli antimicrobici.

**Figura 11.1**

*Lo scambio di plasmide tra cellula donatrice e ricevente.*



Fonte: Wikipedia



- **La Salmonellosi nel cane.**

## **12. La Salmonellosi nel cane: patogenesi, sintomatologia e terapia.**

Secondo il parere di Morse (1975), i patogeni enterici trovano il loro ospite prediletto nel cane, a causa di comportamenti che mette in atto, come la coprofagia e l'ingestione di carogne.

Nonostante ciò, questo microrganismo difficilmente causa la malattia nel cane, piuttosto l'infezione decorre in modo asintomatico; in una piccola quota di infetti il batterio sopravvive nell'ospite, esitando nella condizione di eliminatore. Il bilancio tra la patogenicità del batterio, le difese dell'ospite, l'età giovane o anziana, determinano l'evoluzione dell'infezione da inapparente, allo stato di portatore fino alla forma clinica, enterica o sistemica [Cobb e Stavisky, 2013]. La forma clinica della malattia è rara in cani adulti ed in salute: la manifestazione gastroenterica rappresenta meno del 3% delle gastroenteriti diarroiche del cane [Cobb e Stavisky, 2013]. La malattia è dunque confinata a casi sporadici o in ambienti favorevoli, come i canili. Il batterio, una volta fatto il suo ingresso nel tratto digerente del cane, colonizza rapidamente il grosso intestino ed i linfonodi mesenterici. La fase acuta dell'infezione può durare da quattro a dieci giorni. I segni clinici includono ipertermia, anoressia, diarrea, vomito, perdita di peso e, come conseguenza della setticemia-endotossinemia tosse, emorragie, incoordinazione, parziale paralisi posteriore, cecità, depressione. La mortalità nei casi clinici non supera il 10%. Sono stati descritti casi esitanti in meningite, congiuntivite, osteomielite, polmonite, piotorace, pielonefrite, colangioepatite e sterilità [Cobb e Stavisky, 2013]. Nella fase cronica, che può durare tre o quattro settimane, in genere si presenta diarrea intermittente.

La disseminazione del batterio dall'intestino con le feci può durare circa sei settimane, ma lo stato di portatore può protrarsi più a lungo, finché il batterio persiste a livello linfonodale. Alcune volte, l'infezione può essere complicata, per via della compresenza di più sierotipi. Gli animali giovani e gravidi sono i più a rischio: sono stati riportati casi di metrite, aborto e natimortalità.

L'uso di antimicrobici non è generalmente consigliato nei casi comuni di salmonellosi. Piuttosto la terapia che si instaura è di supporto, basata sulla somministrazione di fluidi per prevenire la disidratazione e correggere il bilancio elettrolitico, associati alla diarrea e al vomito. Tuttavia nei casi gravi è indicata anche la terapia antimicrobica: la scelta dell'antimicrobico deve ricadere sulla base dei test di sensibilità effettuati. Qualora ci si trovi ad agire in urgenza, i farmaci di prima scelta sono: amoxicillina, ampicillina, cloramfenicolo, ceftriaxone, cefotaxime, cefoperazone, ciprofloxacina, trimetoprim-sulfametossazolo. I casi gravi possono essere trattati con l'associazione di ampicillina ed enrofloxacin [Cobb e Stavinsky, 2013]. Se invece, a fronte dei risultati dell'antibiogramma, non si hanno a disposizione principi attivi efficaci registrati per

quell'affezione, la direttiva CE 2004/28 prevede la prescrizione in deroga di un medicinale per uso umano, per uso veterinario di un altro Stato Membro o una formulazione galenica. Questo principio sottolinea nuovamente la centralità del ricorso a una terapia mirata, efficace, a tutela della salute del singolo e della comunità.

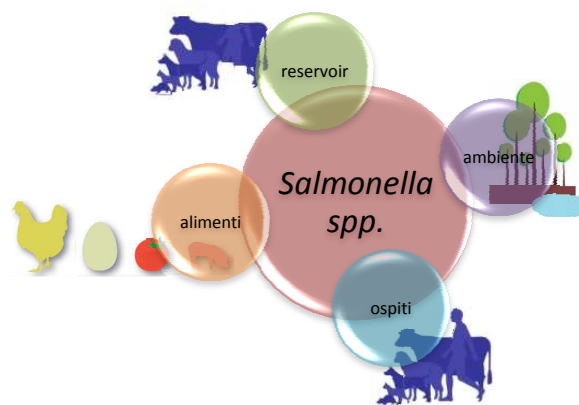
- **La Salmonellosi nell'uomo.**

### 13. Le modalità di trasmissione.

Il ciclo biologico di *Salmonella* è indubbiamente complesso, per la varietà di meccanismi che include: *reservoir* animali, serbatoi ambientali, cibi ed acque quali vettori.

**Figura 13.1**

*Ecologia di Salmonella spp.*



La fonte principale di infezione per l'uomo è rappresentata dal cibo contaminato; la salmonellosi è difatti la seconda tossinfezione alimentare più frequente in Europa.

Gli alimenti più a rischio sono le uova crude, e i prodotti derivanti da esse (dolci, creme, gelati ecc.), il latte crudo, la carne cruda, i frutti di mare, frutta e verdura.

La contaminazione dell'alimento può verificarsi in varie fasi della catena produttiva, dall'origine, alla preparazione, durante il trasporto, dopo la cottura, per cause diverse: irrigazione dei campi con acque inquinate o utilizzo delle stesse per il lavaggio dei vegetali, scorrette manipolazioni degli alimenti, promiscuità tra cibi cotti e crudi, utilizzo indiscriminato di utensili e piani di lavoro, interruzione della catena del freddo [Melis, 2014; <http://www.epicentro.iss.it/problemi/Salmonella/Salmonella.asp>].

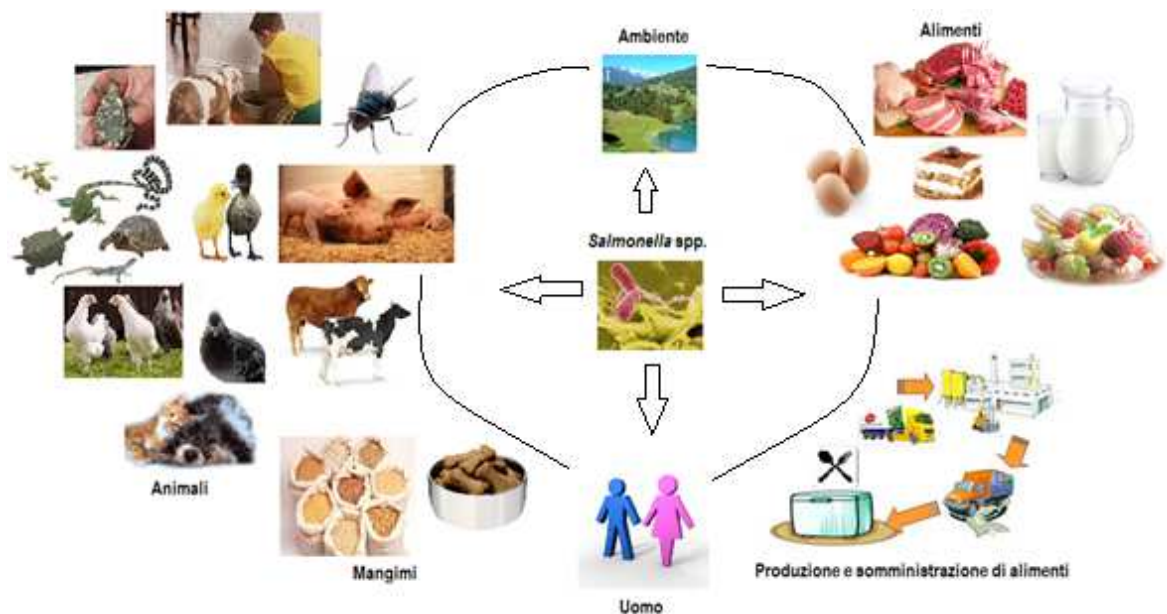
Le più recenti allerte alimentari riguardanti *Salmonella* reperibili sul portale iRASFF (*Rapid Alert System on Food and Feed*) vedono l'isolamento di *Salmonella* Enteritidis fagotipo 6D in tagliatelle provenienti dalla Polonia ed ancora l'isolamento di *Salmonella* Typhimurium da carne di pollo in Francia [<https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/portal/?event=searchResultList>].

Un'altra modalità, seppur più rara, è la trasmissione inter-umana, più frequente in ambito ospedaliero, ed il caso degli O.S.A. (operatori del settore alimentare), i quali nel ruolo di portatori, possono rappresentare un rischio nell'ambito della ristorazione collettiva [Rondanelli *et al.*, 2005].

Altra possibilità di infezione è dovuta al contatto diretto con animali infetti [Tauxe e Pavia, 1998]. La trasmissione di *Salmonella* da animali (polli, cani, gatti, roditori, tartarughe, iguane) è stimata essere pari al 15-20% dei casi totali di infezione nell'uomo [Plaut *et al.*, 1996]. Sono ritenuti comportamenti a rischio il contatto diretto o indiretto con le deiezioni di animali infetti, la manipolazione di mangimi e *petfood* contaminati, l'esposizione alle acque in cui sono alloggiate le tartarughe marine, il contatto con animali portatori asintomatici quali il cane ed i rettili *pet*. Essi sono in serbatoio principale del batterio, che viene eliminato tramite le deiezioni, nella maggior parte dei casi in maniera prolungata ed intermittente [Baldellie Malincarne, 2007]. Un ulteriore veicolo di infezione può essere rappresentato da vettori meccanici (come le mosche).

**Figura 13.2**

*Modalità di trasmissione di Salmonella spp. all'uomo: interazione tra animali, ambiente, alimenti.*

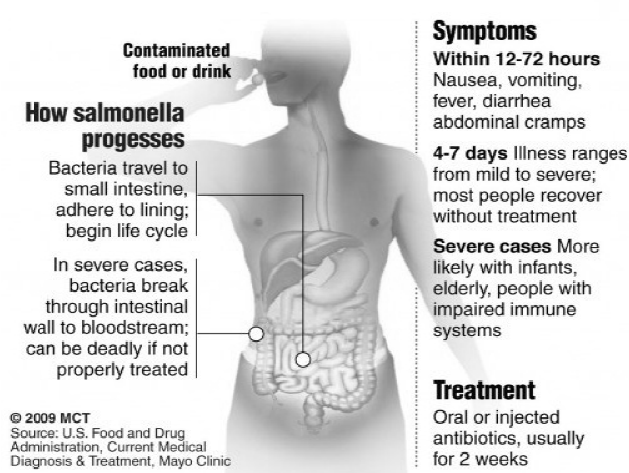


## 14. La sintomatologia.

La sindrome morbosa più frequente associata all'infezione sostenuta da *Salmonella* spp. è la gastroenterite, un'infezione che resta localizzata nell'ileo terminale, nel colon e nei linfonodi mesenterici [Sterzenbach *et al.*, 2013]. L'invasione da parte del batterio a livello di questi tessuti porta allo sviluppo di un infiltrato infiammatorio, rappresentato in prevalenza da neutrofilo: l'esito finale è la necrosi dello strato superiore della mucosa [Sterzenbach *et al.*, 2013]. La risposta infiammatoria dell'ospite è responsabile dei sintomi caratteristici dell'infezione: diarrea, nausea, vomito, crampi addominali e febbre. Queste manifestazioni si presentano rapidamente, dopo un tempo medio di incubazione di un giorno [Glynn e Palmer, 1992]; la durata dei sintomi varia tra 4 e 7 giorni [Acha e Szyfres, 2001].

**Figura 14.1**

*L'infezione da Salmonella nell'uomo.*



Fonte: U.S. Food and Drug Administration.

Nella maggioranza dei casi l'infezione è auto-limitante, però in soggetti particolarmente recettivi come bambini, anziani, immunodepressi, si possono creare le condizioni di batteriemia, per cui il batterio viene disseminato nell'organismo, esitando in patologie molto più serie rispetto alla comune gastroenterite [Miller *et al.*, 2005]. Il passaggio alla forma sistemica è dovuto alla resistenza del batterio alla distruzione da parte del sistema monocitico-macrofagico. I batteri vengono pertanto trasportati dai fagociti ai linfonodi e, tramite il circolo ematico, possono raggiungere sedi diverse.

La malattia sistemica può presentarsi nelle forme di endocardite, polmonite, meningite, osteomielite e artrite, pielonefrite; la possibilità di evocare queste forme morbose non è dovuta

solamente a fattori legati alla patogenicità del batterio, ma all'interazione tra esso, l'ospite e l'ambiente [Darwin e Miller, 1999].

È stato statisticamente dimostrato che ad essere più colpiti dalla malattia sono i soggetti immuno-compromessi, quelli giovani o anziani. In Italia, negli anni 2000-2010, oltre la metà degli isolamenti umani di *Salmonella* appartenevano alla classe d'età 0-14 anni, seguiti dai soggetti sopra i 65 anni (tabella 14.2)[<http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20519>].

**Tabella 14.2**

*Distribuzione dei tassi di isolamento annuali (n° di isolati/100000 abitanti) dei principali serovar di Salmonella riportati in Italia, per classe d'età e sesso.*

Serovar	Tassi di isolamento annuali						
	0-11 mesi	1-5 anni	6-14 anni	15-64 anni	≥65 anni	femmine	Maschi
<b>Typhimurium</b>	3.95	14.40	3.24	0.43	0.77	1.42	1.71
<b>Enteritidis</b>	2.47	6.03	1.99	0.43	0.45	0.91	0.96
<b>4,[5], 12:i:-</b>	0.69	2.36	0.58	0.06	0.16	0.23	0.27
<b>Derby</b>	0.44	0.84	0.15	0.06	0.18	0.14	0.15
<b>Infantis</b>	0.36	0.70	0.18	0.06	0.13	0.13	0.15
<b>Napoli</b>	0.64	1.03	0.20	0.02	0.08	0.10	0.12
<b>altri serva</b>	4.98	7.19	1.66	0.52	1.02	1.12	1.25
<b>Totale</b>	13.54	<b>32.54</b>	8.01	1.60	2.80	4.06	4.62
		<b>54.09</b>					

I soggetti più a rischio sono dunque bambini, anziani, donne gravide, malati, pazienti in cure immunosoppressive come nel caso di trapianti.

## Scopo del lavoro

Questo lavoro di tesi sperimentale ha come tema l'analisi dei profili fenotipici e genotipici di antibiotico-resistenza di *Salmonella* spp. nella popolazione canina presa in esame.

Il genere *Salmonella* comprende microrganismi patogeni sia per l'uomo che per gli animali, col conseguente potenziale rischio zoonotico associato. Questa evenienza rappresenta un problema di salute pubblica, quanto più preoccupante per l'utilizzo, sia in medicina umana che veterinaria, di antimicrobici verso cui i batteri possono sviluppare resistenza tale da compromettere l'efficacia dei trattamenti farmacologici.

Nonostante l'attività di sorveglianza svolta dagli Organi preposti, è ancora difficile tracciare un quadro chiaro della trasmissione di Salmonelle antimicrobico-resistenti dagli animali da compagnia all'uomo, in quanto il monitoraggio ufficiale prevede, quali oggetto di indagine, gli animali di interesse zootecnico e gli alimenti da essi derivati. In considerazione di ciò, l'obiettivo di questo lavoro è stato quello di analizzare campioni di feci di origine canina isolate da parchi pubblici e aree verdi, da canile e da ambulatori veterinari privati, con lo scopo di indagare la diffusione di *Salmonella* spp. nelle diverse popolazioni e la determinazione dei profili di antibiotico-resistenza. Oltre ad una valutazione epidemiologica di *Salmonella* spp., l'analisi dei profili sia fenotipici che genotipici di antibiotico-resistenza dei vari ceppi è stata condotta con l'obiettivo di testare l'efficacia delle principali classi di antimicrobici utilizzate sia in medicina umana che veterinaria. Particolare attenzione è stata rivolta soprattutto verso alcuni farmaci considerati "criticamente importanti" in medicina umana, quali i chinoloni e fluorochinoloni. A riguardo, l'analisi del profilo genotipico di antibiotico-resistenza consente di valutare ed approfondire i principali meccanismi responsabili della diffusione di ceppi insensibili a queste classi di molecole e, di conseguenza, l'impatto che tale fenomeno può avere per la salute pubblica.

- **Materiali e metodi**

### **15. Il campionamento.**

I campioni di feci oggetto dell'indagine sono stati reperiti grazie alla collaborazione con il laboratorio di Malattie Parassitarie del Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute dell'università di Padova.

In particolare sono stati processati:

- 235 campioni di feci di cane (*Canis lupus familiaris*) raccolte in occasione di visite mediche presso ambulatori veterinari privati di Roma e Padova;
- 193 campioni di feci prelevate da cani ospitati in un canile-rifugio di Roma;
- 81 campioni di feci fresche raccolte in aree verdi e spazi pubblici delle Province di Padova, Roma e Teramo.

Tutti i campioni sono stati conservati refrigerati e processati entro le 48 ore dal prelievo.

***Figura 15.1***

---

*Tampone per il prelievo dei campioni.*





## 16. L'isolamento e l'identificazione di *Salmonella*.

Le procedure sfruttate per l'isolamento e l'identificazione di *Salmonella* spp. seguono il protocollo standard per l'isolamento da fonte alimentari, salvo piccole modifiche (ISO 6579:2002: "Microbiology of the food chain. Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of *Salmonella*").

Al fine di isolare e identificare *Salmonella* spp. sono state eseguite le seguenti procedure:

- 1- Prearricchimento non selettivo in brodo;
- 2- Arricchimento selettivo in brodo;
- 3- Semina in terreni selettivi e differenziali (in terreno solido agarizzato);
- 4- Passaggio dei ceppi in terreno differenziale in provetta;
- 5- Prove biochimiche identificative in macrometodo.

1- prearricchimento non selettivo in brodo

E' stato utilizzato il terreno liquido non selettivo *Buffered Peptone Water* (BPW, Oxoid) per consentire la replicazione al *pool* di batteri presenti nel campione. Sono state allestite provette contenenti un volume di terreno BPW di 9 ml per rispettare, col grammo di feci presente nel campione, il rapporto 1:10 (campione : terreno). Si è proceduto incubando le provette in anaerobiosi a 37°C per 18-24 ore.

**Figura 16.1**

---

*Provette allestite con BPW.*



## 2-arricchimento selettivo in brodo

Per inibire la crescita di altri microrganismi a favore di *Salmonella* spp. e renderla successivamente identificabile su piastre Petri, si è utilizzato il terreno *Rappaport Vassiliadis Broth* (RVB, Oxoid). In 10 ml di questo terreno sono stati trasferiti in sterilità 100 µl dal brodo di prearricchimento. Il campione così allestito è stato incubato a 41,5° per 18-24 ore. Dopo questo tempo era possibile valutare l'intorbidimento del campione e lo schiarimento del terreno, dovuti alla probabile crescita di *Salmonella*.

### **Figura 16.2**

*Aspetto del RVB prima e dopo l'incubazione con Salmonella spp.*



## 3-semina in terreni selettivi e differenziali in terreno agarizzato

Per la semina in terreni selettivi e differenziali sono stati utilizzati in contemporanea *Xylose Lysine Tergitol4 Agar* (XLT4, Difco) e *Brilliant Green Agar* (BGA, Oxoid). La semina su piastra è avvenuta per strisciamento secondo la tecnica per quadranti; si è proceduto prelevando con ansa sterile da 10 µl l'aliquota di brodo di arricchimento selettivo e eseguendo poi la semina. Le piastre sono state incubate in anaerobiosi a 37°C per 18-24 ore.

XLT4 è un terreno selettivo per *Salmonella* spp. grazie alla presenza di tergitol. E' possibile distinguere le salmonelle dagli altri batteri sulla base della loro capacità di fermentare gli zuccheri xylosio, saccarosio e lattosio e per la capacità di decarbossilare la lisina; inoltre il terreno contiene sodio tiosolfato che permette di identificare la produzione di idrogeno solfato: questa avviene per precipitazione di ioni ferrici visibile dal colore nero delle colonie. Altra variazione di colore si ha grazie ad indicatori di pH: il terreno vira verso il giallo in caso di fermentazione del lattosio – acidificazione -, o verso il rosso in caso di decarbossilazione della lisina – basificazione -.

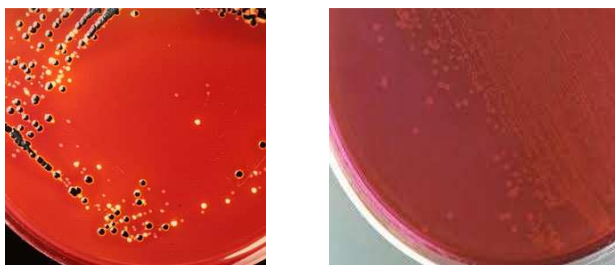
L'altro terreno utilizzato è il *Brilliant Green Agar* (BGA, Oxoid): si tratta di un mezzo altamente selettivo per *Salmonella* spp. dal momento che il verde brillante inibisce la crescita della totalità dei Gram+ e della maggior parte dei Gram-. Oltre al verde brillante è contenuto un indicatore di

pH (rosso fenolo), che vira in base alla fermentazione di lattosio e/o di saccarosio: colonie dall'aspetto rosato sono ascrivibili a *Salmonella* spp.

Trascorso il tempo di incubazione, l'identificazione della colonie di *Salmonella* spp. avviene sulla base dell'aspetto: in entrambi i terreni si assiste al viraggio al rosso in presenza di colonie di *Salmonella* spp; su terreno XLT4 le colonie hanno aspetto tondeggiate, traslucido e di colore nero, o solo il centro è nero (una piccola percentuale di ceppi non induce precipitazione di idrogeno solforato, per cui non si rivela il colore nero), contornate da un piccolo alone giallo; su terreno BGA le colonie hanno forma variabile, di colore rosato contornate da un alone rosso diffuso.

**Figura 16.3**

*Aspetto delle colonie di Salmonella su XLT4 e BGA.*



#### 4-semina in terreno differenziale in provetta

Il terreno differenziale indicato per le *Enterobacteriaceae* è *Kligler Iron Agar* (KIA, Biokar-diagnostics), nella forma solida in provette a becco di clarino: si sfrutta la capacità di fermentare lattosio, destrosio e quella di produrre idrogeno solfato. Si procede prelevando con ansa sterile la colonia sospetta, poi seminata per infissione nel fondo della provetta, mentre viene strisciata sulla superficie. La fermentazione degli zuccheri è possibile sia in profondità (anaerobiosi) che in superficie (aerobiosi) in presenza/assenza di produzione di gas.

I campioni così allestiti, sono stati incubati in aerobiosi a 37°C per 24-48 ore.

I profili che si possono leggere sono derivanti dalla sola fermentazione del destrosio, oppure sia del destrosio che del lattosio o di nessuno dei due: ciò è identificato dal viraggio del terreno, che contiene rosso fenolo, verso il rosso in situazioni di alcalinità, verso il giallo in caso di acidità. Se avviene la sola fermentazione del destrosio, si assiste a colorazione rossa in superficie (alcalinità) e gialla (acidità) in profondità. Se avviene la fermentazione sia del destrosio sia del lattosio, evocando una reazione acida nell'intera provetta. Se non si verifica nessuna fermentazione, l'intera provetta ha reazione alcalina.

Per quanto riguarda la produzione di idrogeno solfato, essa si verifica su terreno KIA in condizioni

di acidità: in presenza di idrogeno solfato si ha la precipitazione del ferro ammonio citrato, indicatore di viraggio, in ferro solfuro nero.

Pertanto, nel caso delle salmonelle, nella provetta si ha becco rosso segnato dallo striscio nero, definito “a coda di topo”, viraggio al giallo nel fondo, poi mascherato dall’annerimento dovuto alla produzione di idrogeno solfato (figura 16.4).

#### ***Figura 16.4***

*Aspetto differenziale del terreno KIA dopo inoculo con batteri a diversa capacità fermentativa e di produzione di H<sub>2</sub>S. A destra aspetto caratteristico di Salmonella spp.*



I campioni che, secondo queste prove, sono riferibili a *Salmonella* spp., al fine di essere conservati e poter eseguire le successive prove, sono inolculati in Agar triptosio a becco di clarino senza fondo.

#### 5-prove biochimiche in macrometodo

Le prove biochimiche in macrometodo per l’identificazione di *Salmonella* spp. sono state condotte su quelle colonie batteriche che avevano manifestato, dalle analisi precedenti, profilo riferibile a *Salmonella*. Dalle patine batteriche sospette si è proceduto con prelievo tramite ansa sterile delle colonie, seminate per infissione nel terreno differenziale *Sim Bios Medium* (SIM, Merk), per verificare la produzione di idrogeno solfato, di indolo e la mobilità.

I campioni così allestiti sono stati incubati in aerobiosi a 37°C per 18-24 ore.

La produzione di idrogeno solfato da parte di *Salmonella* spp. è evidenziata dalla precipitazione dell’indicatore ferro ammonio citrato, il quale precipita in ferro solfuro nero.

La produzione di indolo, assente in *Salmonella* spp., si evidenzia dal triptofano, costituente della caseina presente nel terreno: per rivelare la produzione di indolo, derivante dal metabolismo del triptofano, a seguito dell’incubazione si aggiungono 2-3 gocce di reattivo di Kovac’s sulla superficie del terreno che vira al rosso in presenza di indolo.

**Figura 16.5**

---

*Aspetto del terreno SIM con reattivo di Kovac's (positività a destra). Negatività a destra e positività a sinistra per la produzione di H<sub>2</sub>S.*



La valutazione della mobilità è possibile rilevando l'intorbidimento del terreno dalla linea di infissione; la mobilità è consentita dalla bassa concentrazione di agar nel terreno.

Altra prova biochimica è quella relativa alla degradazione dell'urea, che svela la presenza di ureasi: le salmonelle sono ureasi negative. Si è sfruttato il terreno *Urea Agar Base* (Oxoid UK); dopo essere stato distribuito in provette a becco di clarino, è stato fatto solidificare. Si è proceduto inoculando in superficie le colonie sospette, per poi incubare i campioni così allestiti, in aerobiosi a 37°C per 18-24 ore. La lettura che evidenzia la presenza di ureasi e quindi la scissione dell'urea con produzione di ioni ammonio dal pH alcalino, è consentita dal viraggio dell'indicatore verso il rosso-ciclamino.

**Figura 16.6**

---

*Aspetto del terreno Urea Agar Base: positività per la scissione di urea a destra e negatività a sinistra.*



In ultimo, è stata creata una ceppoteca stoccando i ceppi isolati a -20°C in latte scremato UHT: da questa banca si è attinto per la tipizzazione e l'allestimento degli antibiogrammi.

## **17. La tipizzazione.**

La tipizzazione sierologica è stata eseguita dall'Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Legnaro, presso il Laboratorio di Referenza Nazionale per le Salmonellosi (Laboratorio di Referenza OIE). Per l'invio dei campioni, i ceppi sono stati trasferiti su *Agar Triptosis*, allegando l'accompagnatoria con i relativi esiti delle prove biochimiche. Oltre a ciò, per indirizzare il lavoro dell'IZSve verso un sierogruppo, sono state eseguite prove biochimiche aggiuntive, per verificare la positività o meno alla fermentazione di sorbitolo, dulcitol, salicina e lattosio.

La tipizzazione sierologica è stata eseguita in virtù della metodica classica di agglutinazione su vetrino: sono stati utilizzati sieri a monovalenti e polivalenti anti-*Salmonella*; in particolare sieri monovalenti e polivalenti anti-O per identificare l'antigene somatico e sieri monovalenti e polivalenti anti-H per identificare gli antigeni flagellari.

## 18. I test di sensibilità in vitro: la metodica di Kirby-Bauer.

I ceppi sono stati sottoposti ad antibiogramma seguendo la procedura classica di Kirby-Bauer, per diffusione su gel di agar [Bauer *et al.*, 1966]. La metodica prevede la sospensione di colonie di *Salmonella* spp. in circa 5 ml di *Muller Hinton Broth* (Oxoid, UK), in modo tale da raggiungere 0.5 gradi di torbidità nella scala Mac Farland ( $10^{6-7}$  ufc). Dalla sospensione si preleva con tampone sterile un'aliquota, e si procede a seminare sul terreno per strisciamento in piastre Petri allestite con *Muller Hinton Agar* (Oxoid, UK). Successivamente si procede apponendo i dischetti di cellulosa imbibiti di antibiotico, tramite apposito distributore. Gli antimicrobici utilizzati e le relative concentrazioni sono elencate in tabella 18.1.

**Tabella 18.1**

*Famiglia di appartenenza e concentrazione degli agenti antimicrobici utilizzati.*

CLASSE	ANTIMICROBICO	SIMBOLO	CONCENTRAZIONE
<b>Aminoglicosidi</b>	Kanamicina	K	30 µg
	Streptomina	S	10 µg
	Neomicina	N	30 µg
	Gentamicina	CN	10 µg
<b>Beta-lattamine e associazioni</b>	Ampicillina	AMP	10 µg
	Cefalotina	KF	30 µg
	Cefotaxime	CTX	30 µg
	Amoxicillina + Acido Clavulanico	AMC	20 µg + 10µg
	Ceftazidime	CAZ	30 µg
<b>Chinoloni</b>	Acido Nalidixico	NA	30 µg
	Enrofloxacin	ENR	5 µg
	Ciprofloxacin	CIP	5 µg
	Norfloxacin	NOR	5 µg
	Marbofloxacin	MAR	5 µg
<b>Fenicoli</b>	Cloramfenicolo	C	30 µg
<b>Polipeptidi</b>	Colistina	CT	10 µg
<b>Sulfamidici e associazioni</b>	Sulfamethoxazolo + Trimethoprim	SXT	23,75 µg + 1,75 µg
	Triple Sulfa	SSS	0,25 mg
<b>Tetracicline</b>	Tetraciclina	TE	30 µg

Sono stati testati cinque farmaci appartenenti alla classe dei chinoloni poiché lo studio ha l'intento di focalizzarsi su questa famiglia di farmaci, per le implicazioni che, le eventuali resistenze registrate, hanno in sanità pubblica.

Le piastre così allestite sono state incubate, previo capovolgimento per evitare la condensa, in aerobiosi a 37°C per 18-24 ore.



Trascorso il tempo necessario, gli esiti sono stati ottenuti andando a misurare, ove presenti, gli aloni di inibizione della crescita attorno ai singoli dischetti di cellulosa e confrontando tali valori con i *breakpoints* relativi ad ogni antimicrobico da noi utilizzato. I valori dei *breakpoints*, espressi in millimetri, sono stati elaborati dal *National Commitee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS).

In base a tale confronto si determina se il ceppo è sensibile (S), intermedio (I) o resistente (R).

**Tabella 18.2**

*Breakpoints indicati da NCCLS.*

ANTIMICROBICO	SIMBOLO	CONCENTRAZIONE	R resistente	I Intermedio	S Sensibile
Kanamicina	K	30 µg	≤ 13	14-17	≥ 18
Streptomina	S	10 µg	≤ 11	12-14	≥ 15
Neomicina	N	30 µg	≤ 12	13-16	≥ 17
Gentamicina	CN	10 µg	≤ 12	13-14	≥ 15
Ampicillina	AMP	10 µg	≤ 13	14-16	≥ 17
Cefalotina	KF	30 µg	≤ 14	15-17	≥ 18
Cefotaxime	CTX	30 µg	≤ 14	15-22	≥ 23
Amoxicillina + Acido Clavulanico	AMC	20 µg + 10µg	≤ 13	14-17	≥ 18
Ceftazidime	CAZ	30 µg	≤ 14	15-17	≥ 18
Acido Nalidixico	NA	30 µg	≤ 13	14-18	≥ 19
Enrofloxacin	ENR	5 µg	≤ 16	17-22	≥ 23
Ciprofloxacina	CIP	5 µg	≤ 15	16-20	≥ 21
Norfloxacina	NOR	5 µg	≤ 12	12-15	≥ 16
Marbofloxacina	MAR	5 µg	≤ 14	15-17	≥ 18
Cloramfenicolo	C	30 µg	≤ 12	13-17	≥ 18
Colistina	CT	10 µg	≤ 8	9-10	≥ 11
Sulfamethoxazolo +Trimethoprim	SXT	23,75 µg + 1,75 µg	≤ 10	11-15	≥ 16
Triple Sulfa	SSS	0,25 mg	≤ 12	13-16	≥ 17
Tetraciclina	TE	30 µg	≤ 14	15-18	≥ 19

## 19. Analisi biomolecolari.

Le analisi biomolecolari sono state condotte mediante PCR per la ricerca dei determinanti genici di resistenza ai chinoloni, nella fattispecie eventuali mutazioni cromosomiche a carico dei geni codificanti per le girasi A e B e topoisomerasi IV oltre a quelli aventi localizzazione plasmidica (PMQR).

### 19.1 Amplificazione dei geni *gyrA*, *gyrB*, *parC*, *parE*.

I chinoloni sono stati classificati dall'Organizzazione Mondiale della Sanità come una classe d'importanza critica per il trattamento in medicina umana: essi agiscono inducendo la rottura della doppia elica di DNA del batterio, avendo come *target* i geni codificanti per DNA girasi (*gyrA/B*) dei procarioti e la topoisomerasi IV (*parC/E*) negli eucarioti. Alcuni batteri però possono presentare resistenza ai chinoloni, mediata da meccanismi diversi: mutazioni nelle regioni *target* d'azione dell'antibiotico (*gyrA*, *gyrB*, *parC*, *parE*) oltre che *up-regulation* delle pompe di efflusso o modificazioni di permeabilità tramite le porine. In questo studio sono state analizzate eventuali mutazioni a carico dei geni codificanti per girasi (*gyrA*, *gyrB*) e topoisomerasi IV (*parC*, *parE*).

Per la ricerca delle mutazioni in *gyrA*, *gyrB*, *parC*, *parE* si è proceduto in questo modo:

- 1- estrazione del DNA batterico
- 2- reazione di amplificazione
- 3- corsa elettroforetica
- 4- sequenziamento nucleotidico e analisi delle sequenze.

#### 1- Estrazione del DNA batterico.

L'estrazione del DNA è stata condotta mediante l'utilizzo del *kit High Pure PCR Template Preparation Kit* (Roche Diagnostics), secondo il protocollo indicato dalla ditta produttrice e la quantificazione del DNA estratto è stata eseguita mediante lettura spettrofotometrica con *Nano-Drop 1000 Spectrophotometer* (ThermoFisher Scientific).

#### 2- Reazione di amplificazione.

Per l'amplificazione dei geni *gyrA*, *gyrB*, *parC*, *parE* sono stati utilizzati *primer* descritti in letteratura da Paltansing *et al.*, 2013 (Tabella 19.1.1) ed è stata allestita la seguente miscela di reazione: *2XKapa hotStart Fast* (Kapa Biosystem), 10  $\mu$ M di ogni *primer* oltre a 4 ng di DNA estratto ed acqua per un volume finale di 25  $\mu$ l. L'amplificazione è stata

eseguita nel termociclatore 2720 *Thermal Cycler*: il profilo di amplificazione prevedeva 40 ripetizioni di una fase di denaturazione a 95°C per 15 secondi, la fase di appaiamento a 58°C per 15 secondi, la fase di estensione a 72°C per 15 secondi seguita dalla post-estensione a 72°C per 2 minuti.

***Tabella 19.1.1***

*Elenco dei primer oligonucleotidici utilizzati per l'amplificazione ed il sequenziamento di gyrA, gyrB, parC, parE.*

<i>Primer</i>	<i>Sequenza</i>
<i>gyrA-F</i>	ATGTCGGTCATTGTTGGCCG
<i>gyrA-R</i>	GCCATCAGCTCATGRGCRAT
<i>gyrB-F</i>	TCTACTGCTTYACCAACAACA
<i>gyb-R</i>	CGTCCGCATCGGTCATGAT
<i>parC-F</i>	ATGGCAGAGCGCCTTGCG
<i>parC-R</i>	GCCGTCRAAGTTTGGCAC
<i>parE-F</i>	CGGAAGATATCTGGGATCG
<i>parE-R</i>	TCTCTTCTCCGTCAGYGC

**3- Corsa elettroforetica.**

I prodotti di reazione sono stati separati tramite corsa elettroforetica su gel di agarosio al 2% in *Buffer TBE 1X* con l'aggiunta di 0.1 XI/ml (v/v) di *SybrSafe™ DNA Gel Stain* (Life Technologies Corporation).

Le bande sono state visualizzate con transilluminatore *Gel Doc™ XR* (Bio-Rad) e, per verificare le dimensioni degli amplificati, ad ogni corsa elettroforetica si aggiungeva *pUC Mix Marker 8* (ThermoFisher Scientific) come marcatore di peso molecolare.

**4- Sequenziamento e analisi delle sequenze.**

Prima di procedere al sequenziamento nucleotidico, i prodotti di PCR sono stati purificati utilizzando il kit commerciale *High Pure PCR Cleanup Micro Kit* (Roche Diagnostic Corporation) secondo le specifiche fornite dalla Ditta produttrice e sottoposti a corsa elettroforetica come descritto nel paragrafo precedente. Gli amplificati purificati sono stati inviati a MacroGen, The Netherlands per essere sequenziati in entrambe le direzioni.

Gli elettroferogrammi delle sequenze in *forward* e *reverse* così ottenuti sono stati letti separatamente ed in seguito assemblati per ottenere una sequenza consenso, tramite il software *ChromasPro v1.42* (Technelysium Pty Ltd., Tewantin, Australia).

Le sequenze consenso sono state quindi allineate con quelle di riferimento (presenti in *Genbank*), e confrontate mediante ClustalW del *Pole Bioinformatique Lyonnais* ([http://npsapbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=/NPSA/npsa\\_clustalwan.html](http://npsapbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_clustalwan.html)), utilizzando i parametri di *default* del software.

## 19.2 Ricerca dei geni PMQR -*plasmid mediated quinolone resistance* -.

Uno dei meccanismi più recenti di resistenza ai chinoloni è quella mediata da plasmidi (PMQR – *plasmid mediated quinolone resistance*-), ossia geni *qnr* codificanti per proteine capaci di proteggere i siti *target* di tale classe di molecole antimicrobiche. Ad oggi sono note cinque famiglie, con diverse varianti: *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *qnrS*. Un altro meccanismo di resistenza è quello legato alla presenza ed over-espressione di pompe di efflusso multifarmaco quali quelle codificate dai geni *oqxA* e *oqxB*. Entrambi i meccanismi citati sono trasferibili per via orizzontale, vista la loro frequente localizzazione a livello plasmidico.

La ricerca dei geni *oqxA* e *oqxB* è stata condotta utilizzando i *primer* descritti in letteratura (Kim *et al.*, 2009, Tabella 19.2.1) ed è stata allestita la seguente miscela di reazione: 2XKapa hotStart (Kapa Biosystems), 10 µM di ogni *primer* oltre a 4 ng di DNA estratto ed acqua per un volume finale di 30 µl. L'amplificazione è avvenuta nel termociclatore 2720 Thermal Cycler: il profilo di amplificazione prevedeva 40 ripetizioni; la fase di denaturazione è avvenuta a 95°C per 15 secondi, la fase di appaiamento a 57°C per *oqxA* e 58°C per *oqxB* per 15 secondi, la fase di estensione a 72°C per 15 secondi seguita dalla post-estensione a 72°C per 10 minuti.

Per la ricerca dei geni *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD* e *qnrS* invece è stata allestita la seguente miscela di reazione: 2XKapa hotStart Robust (Kapa Biosystem), 10 µM di ogni *primer* oltre a 4 ng di DNA estratto ed acqua per un volume finale di 15 µl. L'amplificazione è avvenuta nel termociclatore 2720 Thermal Cycler: il profilo di amplificazione prevedeva 40 ripetizioni di una fase di denaturazione è avvenuta a 95°C per 15 secondi, di appaiamento a 58-60°C per 15 secondi e una fase di estensione a 72°C per 15 secondi seguita dalla post-estensione a 72°C per 10 minuti.

I *primer* utilizzati sono stati quelli descritti da Robicsek *et al.*, 2006, Wang *et al.*, 2009 e Cavaco *et al.*, 2009 (Tabella 19.2.1).

### **Tabella 19.2.1**

*Elenco dei primer oligonucleotidici utilizzati per l'amplificazione ed il sequenziamento dei geni PMQR.*

<b>Primer</b>	<b>Sequenza 5'-3'</b>
<i>qnrA-F</i>	ATTTCTACGCCAGGATTTG
<i>qnrA-R</i>	GATCGGCAAAGGTTAGGTCA
<i>qnrB-F</i>	GATCGTGAAAGCCAGAAAGG
<i>qnrB-R</i>	ACGATGCCTGGTAGTTGTCC
<i>qnrC-F</i>	GGGTTGTACATTTATTGAATCG
<i>qnrC-R</i>	TCCACTTTACGAGGTTCT
<i>qnrD-F</i>	CGAGATCAATTTACGGGGAATA
<i>qnrD-R</i>	AACAAGCTGAAGCGCCTG
<i>qnrS-F</i>	ACGACATTCGTCAACTGCAA
<i>qnrS-R</i>	TAAATTGGCACCCGTAGGC
<i>oqxA-F</i>	CTCGGCGGATGATGCT
<i>oqxA-R</i>	CCACTTTCACGGGAGACGA
<i>oqxB-F</i>	TTCTCCCCGGCGGGAAGTAC
<i>oqxB-R</i>	CTCGGCCATTTGGCGCGTA

Come già descritto nei precedenti paragrafi, i prodotti di reazione sono stati separati tramite corsa elettroforetica su gel di agarosio al 2% in *Buffer TBE 1X* con l'aggiunta di 0.1  $\mu$ l/ml (v/v) di *SybrSafe™ DNA Gel Stain* (Life Technologies Corporation).

Le bande sono state visualizzate con transilluminatore *Gel Doc™ XR* (Bio-Rad) e, per verificare le dimensioni degli amplificati, ad ogni corsa elettroforetica si aggiungeva *pUC Mix Marker 8* (ThermoFisher Scientific) come marcatore di peso molecolare.

- **Risultati e discussione.**

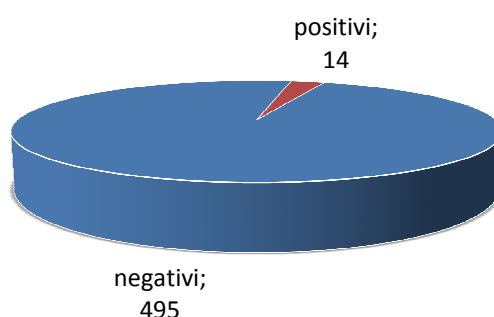
- **Il campionamento.**

Sono stati prelevati in totale 509 campioni, 235 da cani di proprietà eseguiti durante le visite mediche di *routine* da veterinari liberi professionisti, 81 da feci raccolte in parchi e aree verdi di Padova, Roma e Teramo e 193 prelievi da cani di un canile-rifugio romano.

Dei 509 campioni testati, quelli positivi per *Salmonella* spp. sono risultati in totale 14, con una prevalenza del 2,75 % (Grafico A.1).

**Grafico A.1**

*Positività per Salmonella spp. nell'intera popolazione canina campionata.*



La prevalenza di *Salmonella* spp. nei campioni di origine ambulatoriale è risultata particolarmente contenuta (0,85 %) mentre certamente più elevata è la prevalenza osservata nei campioni di origine ambientale (3,77 %) e di quelli prelevati in canile (4,66 %), circa 5 volte più elevata. Quest'ultimo dato può essere giustificato dal fatto che in particolari ambienti favorevoli, quali le comunità come i canili, si registrano prevalenze maggiori (Tabella A.2).

**Tabella A.2**

*Prevalenze osservate nelle varie popolazioni canine oggetto dell'indagine.*

Campionamenti	Campioni positivi	Campioni negativi	Totale	Prevalenza
<b>Totale</b>	14	495	509	2,75 %
<b>-Prelievi da ambulatorio</b>	2	233	235	0,85 %
<b>-Prelievi ambientali</b>	3	78	81	3,77 %
<b>Padova</b>	1	20	21	4,75 %
<b>Teramo</b>	2	2	4	50 %
<b>Roma</b>	0	56	56	0 %
<b>-Prelievi da canile</b>	9	184	193	4,66 %

L'esito ottenuto, circa la prevalenza totale, è in accordo con quella attesa sulla base della maggior parte dei dati bibliografici reperibili in letteratura riferiti a studi condotti tra il 1952 e il 2009, i quali descrivono prevalenze di *Salmonella* spp. comprese tra l'1% ed il 4% in popolazioni canine asintomatiche [Galton *et al.*, 1952; Stucker *et al.*, 1952; Nastasi *et al.*, 1986; Kwaga *et al.*, 1989; Weber *et al.*, 1995; Seepersadsingh *et al.*, 2004; Tsai *et al.*, 2007; Murphy *et al.*, 2009].

*Range* più ampi (tra lo 0.5% e l'11%) e, in taluni casi con percentuali più elevate, sono stati riportati da Bagcigil, con riferimento alle prevalenze riscontrate in diverse Nazioni come la Slovacchia, la Germania, il Colorado, [Bagcigil *et al.*, 2007].

I dati più recenti italiani sono del 2010 con uno studio di Tarsitano *et al.* che non ha registrato nessuna positività da feci raccolte in luoghi pubblici. Uno studio condotto nello stesso periodo, in Veneto, ha registrato una prevalenza del 2% in cani di proprietà [Tamiazzo, 2010]. Nel 2002 uno studio condotto in Italia, da Souza e colleghi, rileva l'1.6% di prevalenza in un campione di 193 cani, sani e sintomatici. Dati storici in Italia risalgono agli anni '70-'80 con gli studi di Nastasi e Corradini, limitati a province come Palermo e Ferrara, dove sono state riscontrate prevalenze rispettivamente del 2.4% e 7.2%.

Come citato in precedenza, secondo studi condotti tra il 1952 e il 2009, la prevalenza rilevata in cani asintomatici è tipicamente tra l'1% ed il 4%; per i cani randagi invece, le prevalenze sono più alte, attorno al 2% e l'11% da studi condotti rispettivamente in Taiwan e Turchia, in virtù del fattore di rischio che il vagabondaggio determina [Leonard *et al.*, 2011].

Sono state rilevate prevalenze del 68-79% in cani da slitta, derivanti probabilmente dalla dieta degli stessi, a base di carne cruda; il dato è confermato da uno studio su di un'altra popolazione di cani alimentati con la medesima dieta, i greyhound [Cobb e Stavisky, 2013].

Da quanto emerso dai diversi studi condotti, in presenza di fattori predisponenti quali le condizioni ambientali e la dieta, le prevalenze aumentano. In particolare, ambienti comunitari quali gli ospedali veterinari e i canili, oltre a campionamenti ottenuti da animali esposti a fattori di rischio come l'alimentazione con carne cruda, il contatto con altri animali, il randagismo sembrano tutte condizioni che favoriscono la diffusione di questo tipo di infezione [Leonard *et al.*, 2011]. Le differenze rilevate tra i vari studi sono frutto sicuramente anche delle diverse modalità di campionamento ed isolamento impiegate, oltre che dal sito geografico relativo, sia per Paese che per luogo (canile, ospedale veterinario, ambiente) [Bagcigil *et al.*, 2007].

I campioni risultati positivi in questo studio provenivano da feci di cane raccolte in parchi ed aree verdi pubbliche delle province di Padova e Teramo, da un ambulatorio veterinario situato in provincia di Padova e da un canile-rifugio della provincia di Roma. Nella tabella sottostante sono elencati i codici identificativi dei campioni positivi, suddivisi per origine e la relativa numerosità (Tabella A.4).

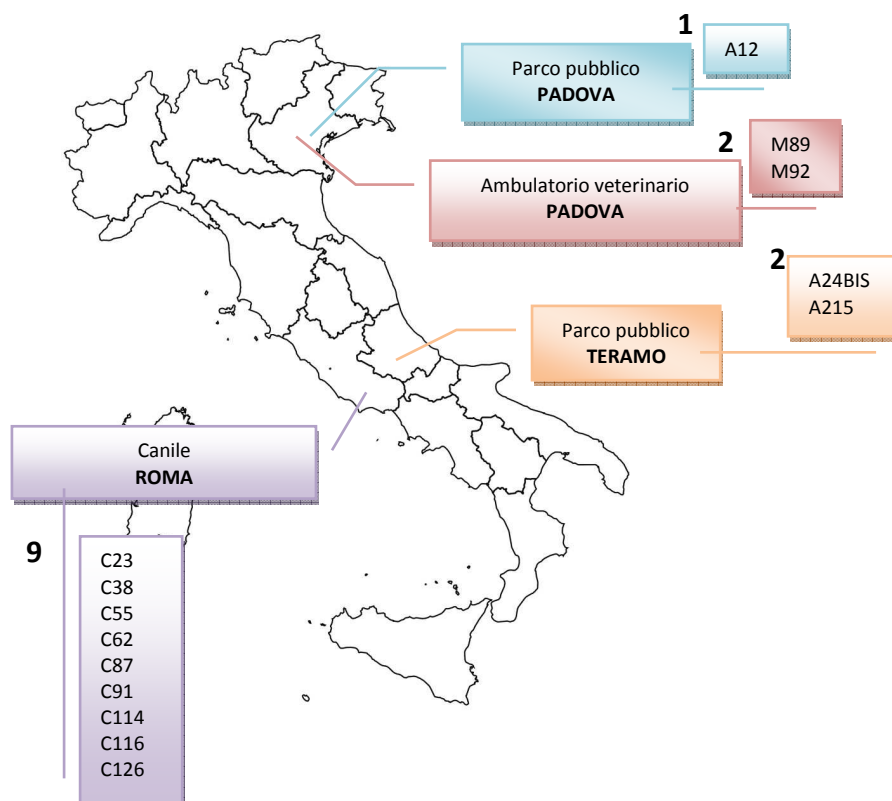
**Tabella A.4**

*Id campione e relativa origine dei prelievi positivi per Salmonella spp.*

ID CAMPIONE	ORIGINE
A12	Parco pubblico - provincia di Padova -
A24 BIS	Parco pubblico - provincia di Teramo -
A215	Parco pubblico - provincia di Teramo -
C26	Canile-rifugio - provincia di Roma -
C38	Canile-rifugio - provincia di Roma -
C55	Canile-rifugio - provincia di Roma -
C62	Canile-rifugio - provincia di Roma -
C87	Canile-rifugio - provincia di Roma -
C91	Canile-rifugio - provincia di Roma -
C114	Canile-rifugio - provincia di Roma -
C116	Canile-rifugio - provincia di Roma -
C126	Canile-rifugio - provincia di Roma -
M89	Ambulatorio veterinario - provincia di Padova -
M92	Ambulatorio veterinario - provincia di Padova -

**Figura A.5**

*Distribuzione geografica e numerosità dei prelievi positivi per Salmonella spp. .*



Nel caso dei prelievi eseguiti in canile o in ambulatorio, è stato possibile raccogliere una breve anamnesi. Per quanto riguarda gli isolati provenienti dal canile della provincia di Roma, sono stati riportati accanto al codice alfanumerico identificativo, il sesso, la razza, la data d'ingresso in canile



e l'età presunta al momento del campionamento. I rilievi effettuati sono schematizzati in tabella A.6.

**Tabella A.6**

*Anamnesi relativa ai campioni provenienti dal canile della provincia di Roma.*

ID	sexso	Razza	Data ingresso in canile	Età presunta *
C26	M	METICCIO	09/03/2012	27 mesi
C38	M	PITT BULL	28/02/2012	75 mesi
C55	M	AMERICAN STAFFORDSHIRE TERRIER	17/10/2006	93 mesi
C62	M	AMERICAN STAFFORDSHIRE TERRIER	11/08/2005	101 mesi
C87	F	AMERICAN PITT BULL TERRIER	22/11/2004	104 mesi
C91	M	METICCIO	30/09/2010	57 mesi
C114	M	METICCIO	25/03/2008	75 mesi
C116	M	METICCIO	19/07/2011	18 mesi
C126	M	MAREMMANO – ABRUZZESE	17/09/2011	33 mesi

\*età presunta al momento del campionamento (08/06/2012)

Per quanto riguarda i campioni prelevati in sede ambulatoriale, in un caso (ID M89) è stato possibile raccogliere, oltre che al segnalamento, un'anamnesi recente e remota, relativa all'ambiente di vita del soggetto, eventuale promiscuità con altri animali e frequenza di aree verdi pubbliche. Nel secondo caso è stato raccolto solo il segnalamento: i dati rilevati sono riportati in tabella A.7.

**Tabella A.7**

*Anamnesi relativa ai campioni di origine ambulatoriale (struttura privata in provincia di Padova).*

ID	sexso	razza	Età	Sintomi enterici	Ambiente di vita del cane	Promiscuità con altri animali	Frequenza aree verdi pubbliche
M89	F	-	96 mesi	SI	CASA e GIARDINO	GATTI	SI
M92	F	NORFOLK TERRIER	9 mesi	-	-	-	-

I campionamenti ambulatoriali e quelli eseguiti nel canile, grazie alle informazioni riguardanti l'età, presunta o effettiva, consentono di analizzare la distribuzione delle positività rilevate in questo studio anche in base a questi fattori, fermo restando che la ridotta numerosità dei campioni positivi a *Salmonella* permette solo considerazioni parziali, la media dei soggetti positivi si

attesta attorno ai 5 anni di età (62,5 mesi). Entrando nel dettaglio, il 9.1% dei cani portatori di *Salmonella* era di età inferiore all'anno di vita. La maggior parte dei positivi, il 54.5%, invece era di età adulta (1-7 anni) e il 36.4% anziana (maggiore di 7 anni). La maggioranza delle positività è stata quindi registrata in soggetti adulti: questo dato è in accordo con quello riportato da altri Autori, come Tamiazzo *et al.* (2010).

Il cane si conferma quindi un importante serbatoio di batteri potenzialmente zoonosici quali *Salmonella* spp., senza sostanziali differenze per età, mentre sostanziale sembra l'influenza legata alle condizioni abitative e alle abitudini alimentari [Bagcigil *et al.*, 2007].

- **La tipizzazione.**

Gli esiti della tipizzazione sierologica, eseguita dall'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, centro di riferimento nazionale della Salmonellosi, sono riassunti in tabella B.1 .

***Tabella B.1***

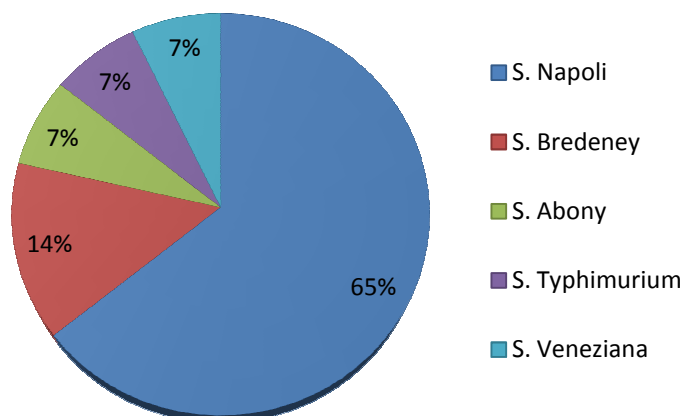
*Risultati della tipizzazione.*

ID CAMPIONE	TIPIZZAZIONE
C38	S. NAPOLI – Gr. D1 – 1,9,12 : l,z13 : e,n,x
C91	S. NAPOLI – Gr. D1 – 1,9,12 : l,z13 : e,n,x
C26	S. NAPOLI – Gr. D1 – 1,9,12 : l,z13 : e,n,x
C87	S. NAPOLI – Gr. D1 – 1,9,12 : l,z13 : e,n,x
C55	S. NAPOLI – Gr. D1 – 1,9,12 : l,z13 : e,n,x
C126	S. NAPOLI – Gr. D1 – 1,9,12 : l,z13 : e,n,x
C114	S. NAPOLI – Gr. D1 – 1,9,12 : l,z13 : e,n,x
C116	S. NAPOLI – Gr. D1 – 1,9,12 : l,z13 : e,n,x
C62	S. NAPOLI – Gr. D1 – 1,9,12 : l,z13 : e,n,x
A215	S. ABONY – Gr. B – 1,4,[5],12,27 : b : e,n,x
M89	S. TYPHIMURIUM VARIANTE MONOFASICA 1,4[5],12 : l : - : ,FAGOTIPO DT7
M92	S. VENEZIANA – Gr. F – 11 : i : e,n,x
A12	S. BREDENEY – Gr. B – 1,4,12,27 : l,v : 1,7
A24BIS	S. BREDENEY – Gr. B – 1,4,12,27 : l,v : 1,7

Il campione M89, identificato come *S. Typhimurium* è stato fagotipizzato: la tipizzazione fagica è stata eseguita dall'IZS delle Venezie, col seguente risultato: *S. Typhimurium* monofasica 1,4[5],12 : l : - : ,FAGOTIPO DT 7.

***Grafico B.2***

*Distribuzione percentuale dei sierotipi isolati.*



Come evidenziato in tabella B.3, diversi autori hanno evidenziato il ruolo cruciale del cane quale serbatoio di oltre 50 diversi *serovar* di *Salmonella* e, in molti casi, è stata riscontrata contemporaneamente la presenza nel medesimo soggetto di più di un sierotipo.

**Tabella B.3**

*Serovar isolati nel cane: bibliografia disponibile.*

<i>Studio</i>	<i>Paese</i>	<i>Serovar</i>
<b>Holt, 1980</b>	<i>Gran Bretagna</i>	Poona
<b>Adesiyun et al., 1997</b>	<i>Cuba</i>	Rubislav, Javiana, Virchow, Jaminara
<b>Caldow e Grham, 1998</b>	<i>Gran Bretagna</i>	Montevideo
<b>Kallo e Hasso, 2001</b>	<i>Iraq</i>	<b>Typhimurium</b> , Give, Enteriditis
<b>Fukuta et al., 2002</b>	<i>Giappone</i>	<b>Typhimurium</b>
<b>Souza et al., 2002</b>	<i>Italia</i>	Saintpaul
<b>Kozak et al., 2003</b>	<i>Slovacchia</i>	Dublin
<b>Maciel et al., 2004</b>	<i>Brasile</i>	Gafsa, Rubisiaw, Carrau, Houtenae
<b>Seepersadsingh et al., 2004</b>	<i>Cuba</i>	28 sierotipi tra cui Javiana, Newport, Arechavaleta, Heidelberg
<b>Kocabiyik et al., 2006</b>	<i>Turchia</i>	Corvalis
<b>Bagcigil et al., 2007</b>	<i>Turchia</i>	Enteriditis, <b>Typhimurium</b>
<b>Verma et al., 2007</b>	<i>India</i>	Weltevreden
<b>Tsai et al., 2007</b>	<i>Taiwan</i>	Dusseldorf, Enteriditis ed altri
<b>Ojo e Adetosoye, 2009</b>	<i>Nigeria</i>	<b>Typhimurium</b>
<b>Tamiazzo, 2010</b>	<i>Italia</i>	<b>Typhimurium</b> , <b>Veneziana</b> , Hadar, Zaiman
<b>Leonard et al., 2011</b>	<i>Canada</i>	<b>Typhimurium</b> , Kentucky, Brandenburg, Heidelberg

*S. Typhimurium*, di gran lunga il sierotipo più di frequente isolato sia nell'uomo che negli animali, è stato riscontrato in un campione di questo studio. Dai dati più recenti provenienti dall'attività di Enter-Vet, solo due dei sierotipi isolati nel presente lavoro, *S. Typhimurium* ed *S. Bredeney*, sono tra i primi quindici riportati tra gli animali, cane escluso (Enter-Vet Report 2012).

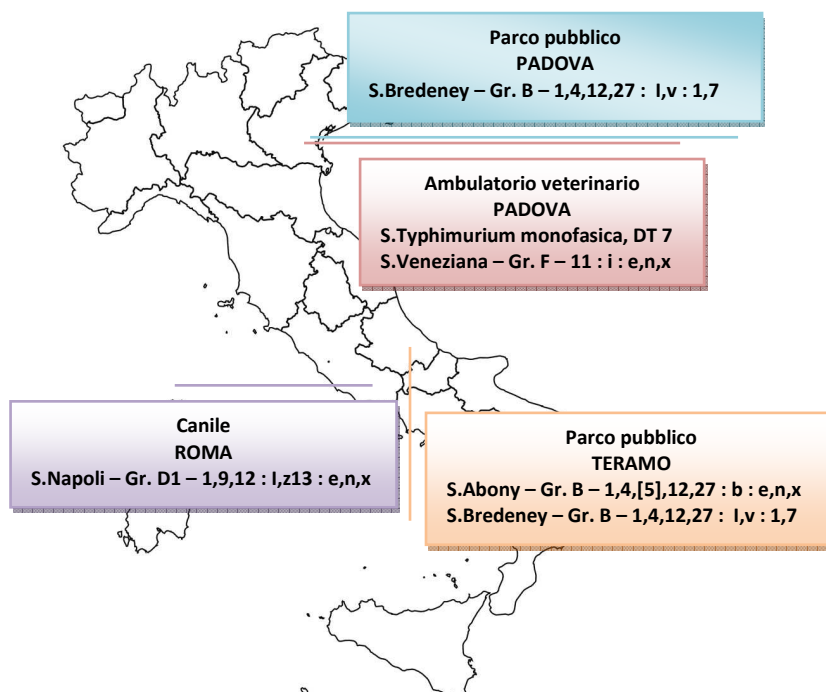
I dati bibliografici disponibili sugli isolamenti dal cane rilevano che i sierotipi più frequenti sono *S. Typhimurium* ed *S. Enteriditis*, universalmente distribuiti, mentre vi sono alcuni *serovar* riscontrati solo in determinate aree geografiche (ad esempio *S. Anatum* è comune tra i cani in USA).

Il sierotipo maggiormente rappresentato nel nostro caso, *S. Napoli*, viene definito emergente in Italia, costituendo il 2-4% degli isolati da infezioni umane; la sua origine zoonotica non è però ancora chiara [Mancini *et al.*, 2014]. La maggior frequenza di *S. Napoli* rilevata in questo studio può essere legata al fatto che, essendo stata riscontrata nel canile, luogo in cui, complice la promiscuità e gli spazi ristretti o sovrappopolati, è certamente facilitata la trasmissione del batterio da soggetto a soggetto. Probabilmente, a seguito dell'introduzione in canile di un soggetto positivo, il batterio, favorito dalle condizioni ambientali, è stato in grado di diffondersi rapidamente nella popolazione che è stata esposta, responsabile quindi di un'infezione che si è

diffusa in comunità.

**Figura B.4**

*Distribuzione dei sierotipi individuati sul territorio italiano.*



Tutti i sierotipi isolati nel presente lavoro di tesi sono da considerare come zoonosici. Nei *report* del CDC per quanto riguarda gli USA e di quello congiunto dell'EFSA con l'ECDC per quanto riguarda l'UE, tutti i sierotipi ritrovati nei campioni oggetto di questo studio sono stati isolati anche da fonti umane. Per quanto riguarda gli isolamenti riportati dal CDC, dal 2000 al 2013 sono stati registrati 65 casi di *S. Abony*, 394 di *S. Bredeney*, 19 di *S. Napoli* e oltre 74.000 di *S. Typhimurium* ed un unico isolato di *S. Veneziana*. In UE, i dati provenienti dal *report* EFSA-ECDC riportano come sierotipo da fonte umana isolato più di frequente sia *S. Typhimurium*, la cui variante monofasica è stata riscontrata in 1.426 isolamenti. In Italia, dai dati ENTER-NET del 2010, sono stati riportati 997 isolamenti di *S. Typhimurium* variante monofasica e 181 di *S. Napoli*. *S. Veneziana* invece sembra essere uno dei sierotipi più diffusi nell'ambiente, mentre *S. Abony* è più rara e riscontrata da fonti di origine animale [EFSA-ECDC 2014; CDC 2013].

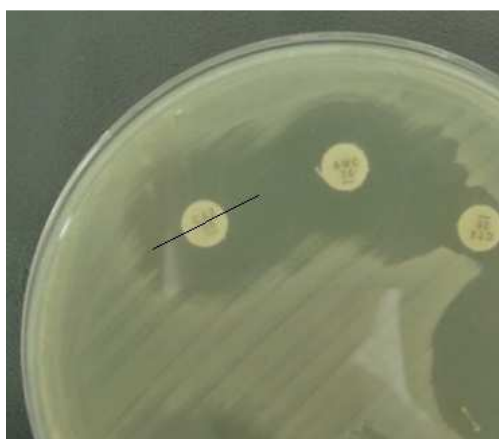
Alcuni Autori hanno notato una similarità tra la distribuzione dei sierotipi nell'ambiente e negli alimenti destinati al consumo animale, soprattutto del cane, con quelli circolanti in questa specie animale. Inoltre, non di rado gli stessi sierotipi sono stati riscontrati anche nell'uomo, a conferma della diffusione di questi ceppi sia nella popolazione animale che umana e, di conseguenza, del potenziale zoonotico di questi ceppi [Carter e Quinn, 2000].

- **Profili fenotipici di antibiotico-resistenza.**

A seguito dell'incubazione delle piastre allestite con la patina batterica ed i dischetti antibiotati, si è proceduto alla misurazione degli aloni di inibizione.

**Figura C.1**

*Esemplificazione della misurazione degli aloni di inibizione.*



Successivamente si è proceduto confrontando le misurazioni rilevate con i *breakpoints* forniti dal *National Commitee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)*, per definire la classe di appartenenza di ogni ceppo nei confronti degli antimicrobici testati, ovvero sensibile (S), intermedio (I) o resistente (R). Gli esiti di tale confronto sono riportati in tabella C.2.

**Tabella C.2**

*Confronto dei risultati con i breakpoints per la definizione di S sensibile, I intermedio, R resistente.*

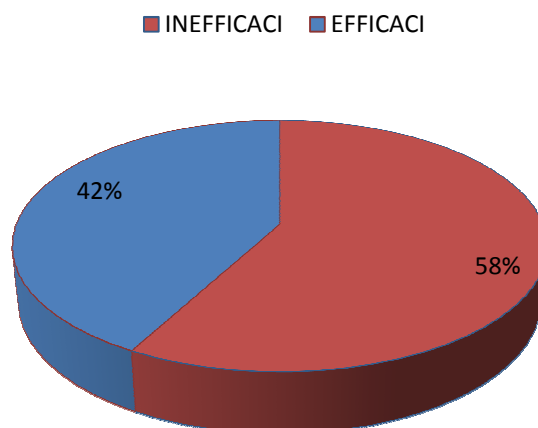
ID	CN	K	S	AMC	AMP	C	CTX	KF	S3	CIP	ENR	NA	TE	SXT	NOR	MAR	CT	N	CAZ
C38	I	R	R	S	S	S	I	S	R	I	I	S	I	S	S	S	I	S	S
C91	I	R	R	S	I	S	I	S	R	I	I	I	I	S	S	S	I	S	R
C26	S	I	I	S	S	S	I	S	R	S	I	S	I	S	S	S	I	S	S
C87	I	R	R	S	I	S	I	S	R	S	I	I	I	S	S	S	I	S	S
C55	I	R	R	S	I	I	I	I	R	S	I	I	I	S	S	S	I	S	I
C114	R	R	R	S	S	I	I	I	R	I	I	I	I	S	S	S	I	S	I
C62	I	R	R	S	S	I	I	S	R	S	I	I	I	S	S	S	I	S	I
M89	S	I	R	S	R	S	S	R	R	S	I	R	R	S	S	S	S	S	S
A12	I	I	R	S	S	S	I	S	R	S	I	I	I	S	S	S	I	S	R
C126	I	R	I	S	S	S	I	S	R	I	I	I	I	S	S	S	I	S	S
M92	I	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	I	R	S	S	S	I	S	S
A215	S	I	I	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
C116	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I
A24 BIS	R	R	R	S	S	I	I	I	R	I	R	S	I	S	S	I	I	S	R

L'analisi del profilo fenotipico di antibiotico-resistenza dei ceppi isolati è preoccupante: oltre la metà degli antimicrobici testati (11 su 19) è risultata, almeno in un caso, inefficace; nella fattispecie si tratta del 58% degli agenti testati mentre poco meno della metà dei farmaci si è rivelata efficace.

### ***Grafico C.3***

---

*Distribuzione percentuale degli agenti antimicrobici efficaci e non efficaci.*



In particolare sono risultati resistenti ad almeno un agente antimicrobico l'85,6% dei ceppi testati; questo dato manifesta la crescente dimensione del fenomeno dell'antibiotico-resistenza in "Salmonelle non tifoidi"; nel 2000 Threlfall ed altri autori registravano il 35,2% dei ceppi resistenti ad almeno un farmaco, percentuale cresciuta, cinque anni più tardi, al 40,8% [Gill *et al.*, 2005].

Tutti i ceppi sono risultati sensibili a neomicina, norfloxacinina e sulfamethoxazolo-trimethoprim, mentre si sono registrati profili intermedi e di sensibilità per cloramfenicolo, cefotaxime, ciprofloxacina, marbofloxacina, colistina; almeno una resistenza per gentamicina, amoxicillina-acido clavulanico, ampicillina, cefalotina, enrofloxacinina, acido nalixico, tetraciclina, ceftazidime, mentre i profili maggiori di refrattarietà sono avvenuti per kanamicina, streptomycinina e associazione trisulfamidica.

In tabella C.4 è riportata, per agente antimicrobico, la presenza di resistenze.

**Tabella C.4**

Presenza di resistenze (almeno una) o assenza, per ciascun antimicrobico.

CLASSE	AGENTE	SIMBOLO	RESISTENZA	
			NO	SI
• BETA-LATTAMINE	Penicilline	Ampicillina		X
	Cefalosporine 1° generazione	Cefalotina		X
	Cefalosporine di 3° generazione	Ceftazidime		X
		Cefotaxime	CTX	X
• ASSOCIAZIONI	Penicilline-inibitore $\beta$ lattamasi	Amoxicillina- acido clavulanico	AMC	X
• AMINOGLICOSIDI		Streptomicina	S	X
		Neomicina	N	X
		Kanamicina	K	X
		Gentamicina	CN	X
• SULFAMIDICI				
ASSOCIAZIONI	Polisulfamidica	Triple sulfa	SSS	X
	Sulfamidici- diaminopirimidine	Sulfamethoxazolo-Trimethoprim	SXT	X
• POLIPEPTIDI		Colistina	CT	X
• FENICOLI		Cloramfenicolo	C	X
• TETRACICLINE		Tetraciclina	TE	X
• CHINOLONI				
	Chinoloni di 1° generazione	Acido Nalixico	NA	X
	Chinoloni di 2° generazione (fluorati)	Enrofloxacin	ENR	X
		Marbofloxacin	MAR	X
		Ciprofloxacina	CIP	X
		Norfloxacin	NOR	X

Diversi studi hanno evidenziato profili significativamente alti di antibiotico-resistenza per *Salmonelle* isolate dal cane [Cobb e Stavisky, 2013].

Le resistenze registrate nei confronti di ampicillina, streptomicina, kanamicina, sulfamidici, tetraciclina, sono di storica data: le evidenze di refrattarietà verso questi principi attivi sono note dagli anni Sessanta [Anderson, 1966]. La resistenza a Streptomicina è un'eventualità frequente, rilevata già negli anni '70-'80 da Pontello, Zavanella ed altri Autori [Zavanella *et al.*, 1973; Pontello *et al.*, 1982]. In concordanza con i risultati di questo studio, sono le poche resistenze nei confronti di tetraciclina, acido nalixico, cloramfenicolo, che si presentavano con un *trend* in diminuzione alla fine degli anni Settanta.

Uno studio del 1999 ha isolato 55 *Salmonelle* spp. da cani randagi: di questi, il 92.6% dei ceppi era resistente a tetraciclina e streptomicina, l'87% all'acido nalixico, il 64.8% alla kanamicina e il 48.1% alla neomicina [Adesiyun, 1999]. Nel 2001, 17 positività su 150 campionamenti, sono state indagate da Kallo e Hasso: gli antibiogrammi hanno fatto emergere la completa sensibilità alla gentamicina e la quasi totalità anche per il cloramfenicolo. A conferma di questi profili vi è il lavoro di Ojo e Adetosoye del 2009, in cui *S. Typhimurium* manifesta sensibilità a ciprofloxacina ed alta sensibilità al cloramfenicolo (89.2%), mentre resistenza verso tetraciclina (70.6%), ampicillina (47.1%), gentamicina (35.3%) e streptomicina (35.3%).



Frequentemente le *Salmonelle* risultano sensibili alle cefalosporine di terza generazione (cefotaxime, ceftazidime), ai fluorchinoloni (ciprofloxacina, enrofloxacin, marbofloxacina, norfloxacina), e pertanto questi farmaci sono impiegati con efficacia in terapia umana.

In questo studio sono però state rilevate resistenze a ceftazidime ed enrofloxacin. Per quanto riguarda le resistenze ai chinoloni, in particolare all'acido nalixico, queste sono rilevate anche in altre ricerche: si può citare il lavoro di Izumiya ed altri Autori, che segnalano alti livelli di resistenze all'acido nalixico e alla ciprofloxacina, oltre che altri farmaci come ampicillina, tetraciclina, sulfamidici, streptomycin ed ancora lo studio di Michael ed altri Autori, in cui è rilevata la refrattarietà all'acido nalixico [Izumiya *et al.*, 2005; Ryanet *et al.*, 2011].

Meno segnalazioni vi sono a riguardo della resistenza all'enrofloxacin: sono note resistenze negli avicoli e nei suini, oltre che nell'uomo, come segnalato dalla *Food and Drug Administration* (FDA) [Biffi *et al.*, 2014; Pallo-Zimmermann *et al.*, 2006]. Studi condotti in Spagna rivelano l'emergenza di ceppi di *Salmonella* resistenti ai fluorchinoloni, ponendo serie preoccupazioni in sanità pubblica [Pallo-Zimmermann *et al.*, 2006].

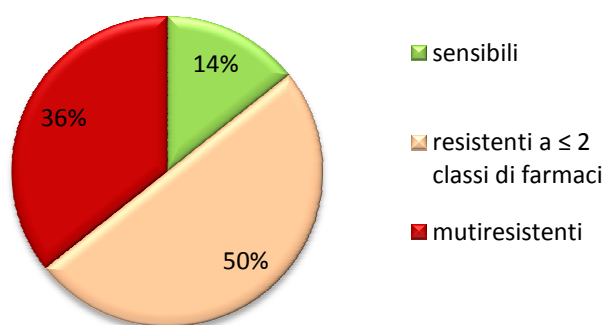
Per confrontare le resistenze in ambito veterinario con quelle in medicina umana, si riportano alcuni dati significativi: i risultati dell'attività di sorveglianza nell'uomo svolta dal CDC dagli anni 1996 al 2012, segnano un aumento delle resistenze alla cefalotina, l'amoxicillina-acido clavulanico e l'acido nalixico, mentre in calo sono le resistenze alla streptomycin (benché essa faccia registrare le percentuali più elevate di resistenze) e alla kanamicina. Il report dell'attività di EFSA-ECDC nel 2011 segnala che i profili di resistenza espressi da *Salmonelle* da fonte umana sono maggiormente rivolte verso le tetracicline (27.1%), seguite dall'ampicillina (26.6%).

Il problema dell'antibiotico-resistenza è dunque un tema comune alla medicina veterinaria ed umana, tanto più preoccupante quanto più frequenti si fanno le segnalazioni delle multi resistenze [Rapporto EFSA-ECDC 2011].

### ***Grafico C.5***

---

*Sensibilità, resistenze e multiresistenze dei ceppi.*



Il 50% dei ceppi testati in questo studio è risultato resistente ad al massimo due classi di farmaci, di cui il 14.28% nei confronti dei soli sulfamidici ed il restante 35.72% agli amminoglicosidi oltre che ai sulfamidici.

Il 35.7% dei ceppi analizzati è multiresistente, ovvero insensibile ad antimicrobici appartenenti ad almeno 3 classi diverse: il profilo più comunemente espresso è la resistenza ad amminoglicosidi, sulfamidici e beta-lattamici a cui si aggiungono, nel caso della resistenza registrata a 4 e 5 famiglie antimicrobiche, le tetracicline ed i chinoloni.

Benché sia difficile confrontare questi risultati con quelli provenienti da altri studi, sia per il differente *pattern* di multiresistenza manifestato dai diversi sierotipi isolati nelle ricerche, sia per il numero ridotto delle positività riscontrate in questo campionamento, il dato totale sulle multiresistenze è in accordo con quanto rilevato ad, esempio, nel 2012 dagli isolati di origine non umana nelle Marche (41.8%). E' da notare però che i ceppi sensibili sono significativamente ridotti rispetto a questi ultimi (47,4% nelle Marche).

Per quanto riguarda i dati provenienti da fonti umane, il rapporto 2011 EFSA-ECDC segnala ceppi resistenti a dieci antimicrobici, tra cui ampicillina, cefotaxime, cloramfenicolo, ciprofloxacina, acido nalixico, gentamicina, kanamicina, streptomina, sulfonamidi, tetracicline e trimethoprim.

**Tabella C.6**

*Resistenze singole o multiresistenze tra i campioni.*

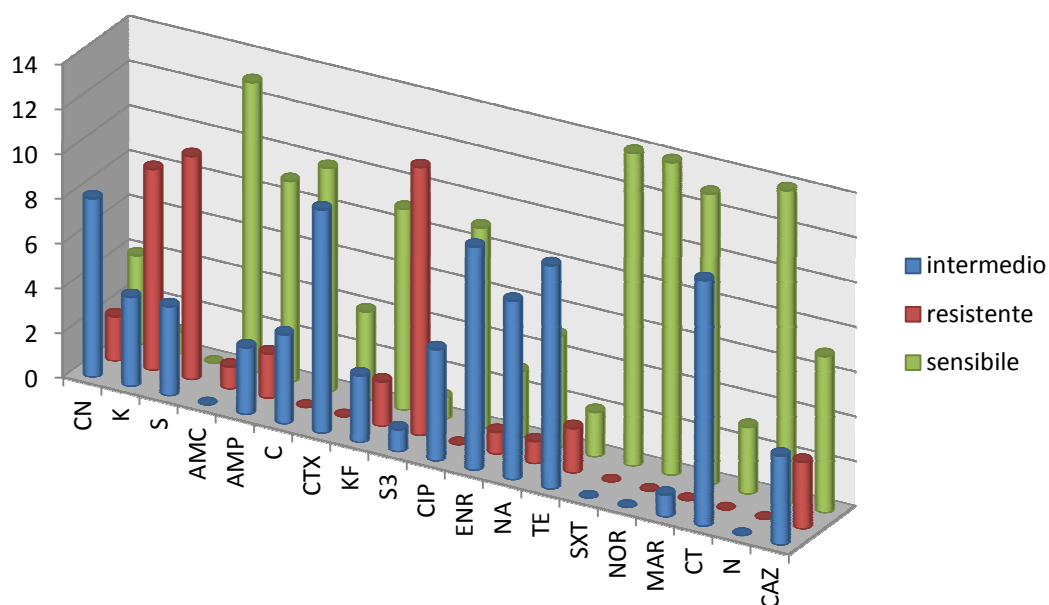
N° di resistenze per classi antimicrobiche	N° di ceppi	%	ID campione	Sierotipo
0	2	14.3%	C116 ; A215	Napoli, Abony
1	1	7.1%	C26	Napoli
2	6	42.9%	C38 ; C87 ; C55 ; C114 ; C126 ; A12	Bredeney, Napoli
3	2	14.3%	C91 ; C62	Napoli
4	2	14.3%	A24BIS ; M92	Bredeney, Napoli
5	1	7.1%	M89	Typhimurium

Viene riportato il profilo completo registrato per ogni antimicrobico, definito secondo le classi sensibile, intermedio e resistente elaborate dal NCCLS.

**Tabella C.7***Analisi del profilo di resistenza per ciascun farmaco.*

Antimicrobico (sigla)	I Intermedio	R Resistente	S Sensibile	I+R somma intermedio-resistente
CN	8	2	4	10
K	4	9	1	13
S	4	10	0	14
AMC	0	1	13	1
AMP	3	2	9	5
C	4	0	10	5
CTX	10	0	4	10
KF	3	2	9	5
S3	1	12	1	13
CIP	5	0	9	5
ENR	10	1	3	11
NA	8	1	5	8
TE	10	2	2	12
SXT	0	0	14	0
NOR	0	0	14	0
MAR	1	0	13	1
CT	11	0	3	11
N	0	0	14	0
CAZ	4	3	7	7

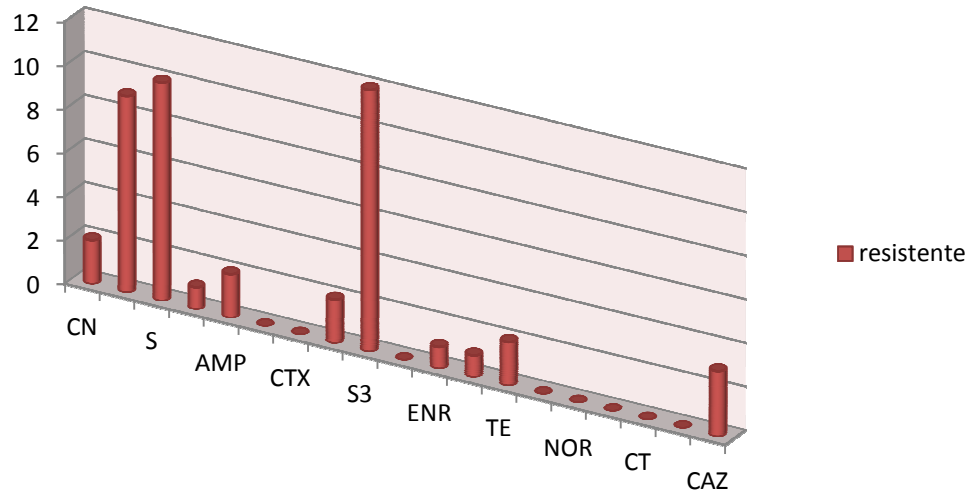
Il maggior numero di resistenze sono state fatte registrare dall'associazione trisulfamidica (12 su 14 ; 85.7%) e dalla classe degli aminoglicosidi (streptomina 10 su 14, 71.4% ; kanamicina 9 su 14, 64.3%). I farmaci più efficaci sono risultati i chinoloni di seconda generazione (eccetto enrofloxacin), cloramfenicolo, l'associazione sulfamethoxazolo-trimethoprim, neomicina tra gli aminoglicosidi, cefotaxime tra i beta-lattamici e, infine, colistina.

**Tabella C.8***Profilo completo di sensibilità agli antimicrobici.*

Sono state registrate resistenze, in ordine di numerosità, rispettivamente a triplesulfamida (85.7%), streptomina (71.4%), kanamicina (64.3%), ceftazidime (21.4%), gentamicina (21.4%), ampicillina (14.3%), cefalotina (14.3%), tetraciclina (14.3%), amoxicillina-acido clavulanico (7.1%), enrofloxacin (7.1%) e acido nalidixico (7.1%).

**Tabella C.9**

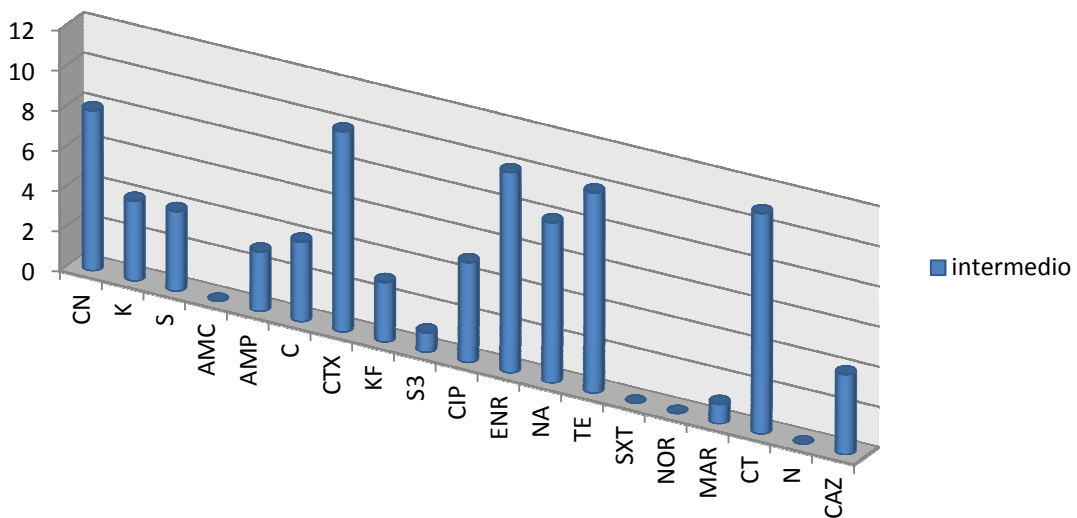
*Il dettaglio dei profili di resistenza.*



Sono stati registrati profili intermedi e di sensibilità per colistina (I=78.6%; S=21.4%), cefotaxime (I=71.4%; S=28.6%), ciprofloxacina (I=35.7%; S=64.3%), cloramfenicolo (I=35.7%; S=64.3%) e marbofloxacina (I=7.1%; S=92.9%).

**Tabella C.10**

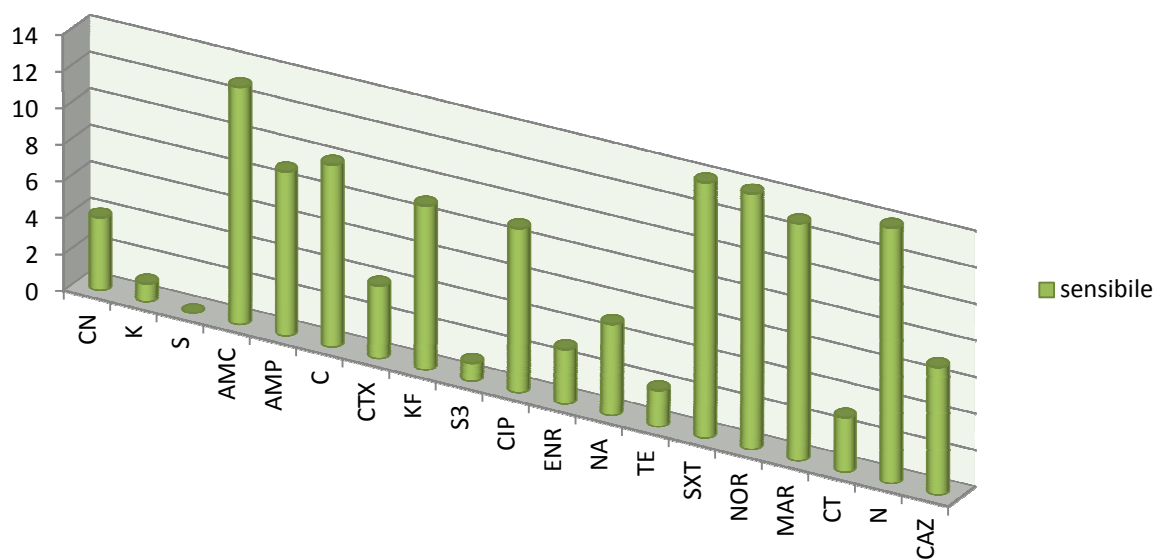
*Il dettaglio dei profili intermedi.*



Una sensibilità totale dei ceppi (100%) è stata fatta registrare da neomicina, norfloxacina e dall'associazione sulfamethoxazolo-trimethoprim.

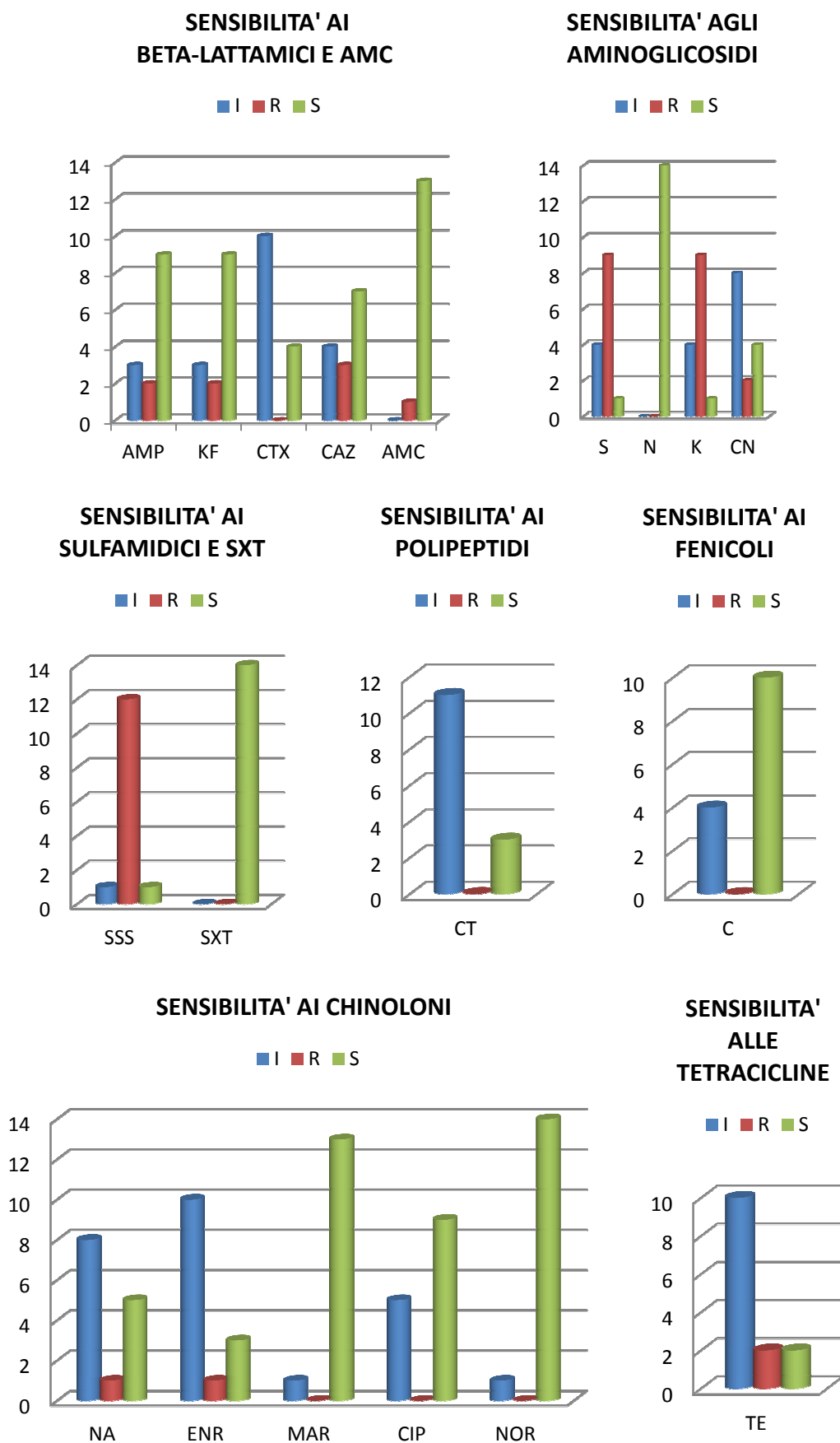
**Tabella C.11**

*Il dettaglio dei profili di sensibilità.*



**Tabella C.12**

*Risultati degli antibiogrammi per famiglie antimicrobiche.*



Analizzando i profili di antibiotico-resistenza per ciascuna popolazione canina (cani di proprietà e cani accolti presso il canile) si possono trarre diverse conclusioni: entrambi i ceppi provenienti da prelievi ambulatoriali si sono mostrati multiresistenti, con un profilo di resistenza nei confronti di amminoglicosidi, sulfamidici, tetracicline, beta-lattamici e, un ceppo, anche ai chinoloni. Questo dato può essere messo in relazione al fatto che i cani di proprietà sono stati probabilmente sottoposti a trattamenti antimicrobici nel corso della loro vita: è noto infatti che ad accelerare notevolmente la diffusione delle resistenze agli antimicrobici è la pressione selettiva esercitata dai farmaci. Nel nostro caso ciò può essere veritiero per il campionamento eseguito sul soggetto M89 di 8 anni che, vista l'età e il riscontro frequente di una sintomatologia enterica riconducibile a gastroenteriti (diarrea), può aver necessitato di antimicrobici nell'arco della sua vita. L'importanza che ha questo rilievo, è data dalle molteplici occasioni quali possibili abitudini che favoriscono la trasmissione del batterio tra cane e proprietario, in particolare la condivisione degli stessi ambienti e il contatto diretto. Poiché sono state raccolte anche informazioni circa l'anamnesi ambientale riferita al soggetto, si ricorda che quest'ultimo viveva insieme ad altri animali (un gatto), e che spesso frequentava aree verdi pubbliche. Pertanto, oltre alle implicazioni di salute pubblica che derivano da quest'ultima abitudine, legata soprattutto alla possibile contaminazione ambientale attraverso la via fecale, potrebbe essere interessante approfondire l'eventuale positività del proprietario e degli altri soggetti che condividono l'ambiente con il cane l'ambiente domestico, e valutare se si tratti del medesimo ceppo.

I prelievi ambientali risultati positivi per *Salmonella* spp. in questo studio, con buona approssimazione, possono essere ascrivibili a cani di proprietà, vista sia la ridotta dimensione del fenomeno del randagismo nelle regioni del Veneto e dell'Abruzzo [[http://www.governo.it/GovernoInforma/Dossier/campagna\\_cani/allegati/scheda\\_dati\\_regionali\\_randagismo.pdf](http://www.governo.it/GovernoInforma/Dossier/campagna_cani/allegati/scheda_dati_regionali_randagismo.pdf)], sia per il luogo dove sono stati eseguiti i prelievi, ossia parchi pubblici, tipicamente frequentati da animali. Inoltre, i profili ottenuti dall'analisi delle sensibilità alle molecole di antimicrobici, evidenziano la presenza in ambienti frequentati a scopo ricreativo specialmente da bambini, di batteri spesso antibiotico-resistenti. In particolare un ceppo (A12) è risultato resistente a due classi antimicrobiche (amminoglicosidi e sulfamidici), mentre un altro (A24BIS) a quattro famiglie (amminoglicosidi, sulfamidici, beta-lattamici e chinoloni), tra cui l'enrofloxacin. Questo dato ha un impatto non trascurabile in salute pubblica, viste le molteplici modalità con cui questi batteri possono infettare anche l'uomo e diffondere nell'ambiente, soprattutto nelle aree verdi pubbliche frequentate spesso dai soggetti più vulnerabili quali bambini ed anziani. Inoltre, avendo questo ceppo (A24BIS) un profilo particolarmente interessante per quanto riguarda l'antibiotico-resistenza, un'infezione sostenuta da questo batterio potrebbe risultare preoccupante, soprattutto per le opzioni terapeutiche limitate che

implicano un allungamento dei tempi di guarigione e, con essi, i costi sanitari che ne deriverebbero. Dall'analisi dei profili fenotipici di antibiotico-resistenza, insieme alla tipizzazione sierologica dei ceppi di *Salmonella* isolati dal canile, risultati tutti *S. Napoli*, si possono formulare due ipotesi: si può supporre che si tratti di uno stesso clone batterico che, una volta fatto ingresso nel canile, facilmente si sia diffuso negli altri soggetti, oppure che ci si trovi di fronte a ceppi diversi. Tutti gli isolati infatti, esprimono identico profilo di sensibilità ad alcune molecole quali l'associazione dell'amoxicillina con l'acido clavulanico e il sulfamethoxazolo con il trimethoprim, neomicina, norfloxacin e marbofloxacin. Tuttavia, non tutti i ceppi hanno mostrato lo stesso profilo per quanto riguarda il trisulfamidico, kanamicina, colistina e ceftazidime. E' pertanto possibile ipotizzare che a circolare in canile siano ceppi diversi oppure che uno stesso ceppo possa aver acquisito, grazie all'interazione con la flora microbica intestinale dei diversi soggetti, determinanti genici di antibiotico-resistenza attraverso il trasferimento orizzontale mediato da elementi mobili di DNA quali i plasmidi. A confermare queste ipotesi saranno le indagini molecolari che, attraverso la tipizzazione molecolare e la determinazione dei profili genotipici di antibiotico-resistenza, potranno dare maggiori indicazioni sull'origine di questi ceppi e sulle loro caratteristiche genetiche. Tali riscontri, insieme alle ipotesi formulate, evidenziano da un lato il ruolo del cane quale *reservoir* di batteri antibiotico-resistenti potenzialmente zoonotici, di per sé motivo di preoccupazione per le difficoltà nel trovare un trattamento farmacologico efficace in caso di infezione, dall'altro la possibilità che questi microrganismi possano fungere da serbatoi di geni di resistenza facilmente trasmissibili orizzontalmente attraverso plasmidi alla normale microbiota o ad eventuali altri batteri, anche patogeni, presenti nell'intestino degli animali e dell'uomo favorendo così la diffusione dell'antibiotico-resistenza.



- **Profili genotipici di antibiotico-resistenza.**

Le indagini biomolecolari hanno rilevato la presenza di una mutazione a livello del gene *gyrA* che, come già accennato, è insieme a *gyrB*, *parC* e *parE*, uno dei principali siti cromosomici *target* di chinoloni e fluorochinoloni in *S. Typhimurium* monofasica DT7 (M89). In particolare, l'analisi delle sequenze nucleotidiche ha evidenziato la presenza di una sostituzione nucleotidica (G con A) responsabile di una sostituzione aminoacidica in posizione 87 di un acido L-aspartico con una asparagina (Asp-Asn 87) nel gene *gyrA*.

Tali mutazioni, soprattutto se multiple, come già evidenziato da diversi Autori in letteratura, conferiscono una ridotta sensibilità ai chinoloni dei batteri che le presentano. Questo rilievo è stato riscontrato nell'unico ceppo di *S. Typhimurium*, risultato resistente all'acido nalidixico e con una ridotta sensibilità nei confronti dell'enrofloxacin (analogo della ciprofloxacina ad uso umano), uno dei farmaci ad ampio spettro che più comunemente viene prescritto per la terapia delle infezioni negli animali da compagnia. Tale riscontro, pur essendo confortante data la positività in uno solo dei 14 ceppi testati, è comunque degno di nota poiché, essendo stato isolato da un cane che vive in stretto contatto con l'uomo e che con questo condivide anche spazi verdi ad uso pubblico, può rappresentare un pericolo per la salute pubblica, data soprattutto la facilità con cui potrebbe essere trasmesso all'uomo attraverso la via oro-fecale. Tuttavia, essendo tale mutazione presente in un gene localizzato a livello cromosomico, la resistenza che da essa deriva può essere trasmessa esclusivamente per via verticale dal batterio alle proprie cellule figlie, mentre non può essere trasferita per via orizzontale, cosa che invece avrebbe destato certamente maggiore preoccupazione. Come già accennato, le resistenze ai chinoloni associate a mutazioni puntiformi nel DNA genomico batterico sono state segnalate da più Autori di tutto il mondo sia in ceppi di origine umana che animale [Izumiya *et al.*, 2005; Pallo-Zimmermann *et al.*, 2010; Ryan *et al.*, 2011; Biffi *et al.*, 2014]. Determinando una ridotta efficacia ad una classe di farmaci di critica importanza in terapia umana, quali i chinoloni, e dati i sempre più frequenti riscontri di ceppi resistenti verso queste molecole, tale fenomeno rappresenta certamente un'emergenza per la sanità pubblica e per questo necessita di approfondimenti attraverso ricerche sempre più mirate volte a definire le principali vie attraverso le quali le resistenze compaiono e diffondono negli animali, nell'ambiente e nell'uomo, definendo così strategie adeguate al loro contenimento. Come già accennato, ancor più preoccupante sarebbe stato il riscontro di isolati positivi per geni PMQR – *plasmid mediated quinolone resistance qnrA, qnrB, qnrC, qnrD, qnrS* e *oqxA/oqxB*.

Questi geni infatti, codificanti per proteine in grado di mascherare la DNA girasi oppure codificanti per pompe di efflusso multifarmaco capaci di ridurre la penetrabilità del farmaco nella cellula batterica, essendo prevalentemente a localizzazione plasmidica, potrebbero diffondere

facilmente da un ceppo all'altro anche per via orizzontale. L'acquisizione di plasmidi da parte dei batteri con queste caratteristiche, garantirebbe un vantaggio a questi ultimi, rendendoli capaci di sopravvivere in condizioni prima letali, per esempio in presenza di una pressione selettiva esercitata dalla presenza di molecole antimicrobiche [Lensky, 1998; Thomas and Nielsen, 2005]. Benché la scoperta di questi geni sia piuttosto recente, si segnalano positività in diversi batteri, soprattutto negli appartenenti alle *Enterobacteriaceae* tra cui *Salmonella* spp. [Ahmed *et al.*, 2009; Hopkins *et al.*, 2007]. Alla luce dell'impatto che la presenza di tali strutture geniche possono avere per la salute pubblica, è di certo confortante il loro mancato riscontro nei ceppi oggetto di questo studio. Tuttavia, data la numerosità limitata dei ceppi testati e la mancanza di informazioni in merito alla presenza di altri meccanismi o determinanti genici capaci di conferire resistenza ad altre classi di molecole (dati ad oggi non ancora disponibili perché le indagini molecolari sono ancora in corso), non è ancora possibile formulare pareri o conclusioni circostanziate in merito, se non sottolineare l'importante ruolo che gli animali da compagnia possono ricoprire nella diffusione del fenomeno dell'antibiotico-resistenza.

## • Conclusioni.

Gli esiti dell'indagine epidemiologica condotta nella popolazione canina oggetto di questo studio attestano una prevalenza di infezione da *Salmonella* spp. pari al 2,75 %, rilevata con le tecniche batteriologiche classiche. Questa percentuale è in accordo con la maggior parte dei dati bibliografici disponibili, che segnalano prevalenze comprese tra 1 e 4%. Il rilievo di una positività pari al 4,66 % nei campioni prelevati in canile, conferma che tale ambiente di comunità favorisce la diffusione di batteri da un soggetto all'altro, come già dimostrato anche da altri Autori. Nonostante il dato di prevalenza complessiva rilevato sulla totalità della popolazione canina analizzata non sia elevato, il nostro studio evidenzia un possibile ruolo epidemiologico del cane quale fonte di infezione per l'uomo. A tal proposito va sottolineato che il campionamento è stato effettuato una sola volta per soggetto, pertanto la prevalenza rilevata potrebbe rappresentare un dato sottostimato, in funzione della peculiarità insita nell'eliminazione intermittente che caratterizza di questo microrganismo.

Tutti i sierotipi isolati nel presente lavoro (*S. Abony*, *S. Bredeney*, *S. Napoli*, *S. Typhimurium*, *S. Veneziana*) sono stati precedentemente isolati in casi di infezione nell'uomo; tale dato pone l'accento e conferma pertanto il possibile il ruolo del cane come serbatoio e fonte di diffusione di infezioni zoonosiche, classicamente legate alla trasmissione per via alimentare.

In particolare si segnala la presenza di *S. Typhimurium*, di gran lunga il *serovar* più rappresentato sia tra gli isolamenti di origine umana che non umana. Nonostante le indagini biomolecolari volte alla determinazione dei profili genotipici di antibiotico-resistenza siano ancora in corso, da una prima indagine sui principali meccanismi coinvolti nella comparsa e diffusione di resistenze ai chinoloni, una delle più importanti classi di antimicrobici sia in medicina veterinaria che umana, questo ceppo ha mostrato resistenza fenotipica a queste molecole, giustificata anche dalla presenza di mutazione nei siti *target* a carico di *gyrA*. La maggior frequenza del sierotipo Napoli, rilevata nel presente lavoro di tesi, può essere dovuta al fatto che un ceppo, una volta entrato in un ambiente di comunità quale il canile, diffonde facilmente nella popolazione. Inoltre, considerando la sierotipizzazione delle *Salmonelle* circolanti nel canile, unitamente alle informazioni ottenute dallo studio dei profili fenotipici di antibiotico-resistenza di questi ceppi, si può supporre che si tratti di uno stesso clone originale che, una volta entrato in questo ambiente comunitario, sia stato in grado di infettare più soggetti: gli isolati infatti, oltre ad essere tutti dello stesso sierotipo, esprimono identico profilo di sensibilità alle associazioni amoxicillina-acido clavulanico e sulfamethoxazolo-trimethoprim, alla neomicina e a norfloxacin, marbofloxacin. E' inoltre sovrapponibile anche il profilo di resistenza all'associazione trisulfamidica, fatta eccezione per un ceppo che è risultato sensibile. Quasi la totalità dei ceppi è resistente alla kanamicina, si

evidenziano una sensibilità ed un profilo intermedio; un solo ceppo ha mostrato resistenza verso la colistina e lo stesso dicasi per il ceftazidime. Il rilievo di profili fenotipici quasi del tutto sovrapponibili, depone a favore della teoria sopra formulata e porta a pensare che le lievi differenze riscontrate per quanto riguarda la sensibilità ad alcune molecole, possano essere il risultato dell'interazione del clone con la flora microbica intestinale di ciascun individuo, che può aver portato all'acquisizione, da questa, di determinanti genici di antibiotico-resistenza diversi tali da essere poi evidenziati con profili fenotipici diversi. Soltanto le analisi finalizzate alla tipizzazione molecolare di questi ceppi, attualmente in corso, mediante *Multilocus Sequence Typing* (MLST) chiariranno definitivamente la loro origine e, di conseguenza, la validità della nostra teoria.

Nel complesso, l'analisi dei profili fenotipici di antibiotico-resistenza evidenzia alcuni aspetti degni di nota. Infatti, il nostro studio non solo conferma il ruolo del cane come *reservoir* di specie batteriche zoonosiche potenzialmente patogene, ma evidenzia anche come la trasmissione di queste infezioni possa essere frequentemente correlata alla circolazione di stipiti batterici resistenti ai principi attivi comunemente utilizzati per la terapia sia in medicina veterinaria che umana. Oltre la metà degli antimicrobici testati è risultata infatti, almeno in un caso, inefficace.

Data l'importanza che la terapia antimicrobica svolge nei diversi ambiti della medicina, la situazione generale qui descritta può essere definita piuttosto allarmante come già evidenziato da altri Autori in diverse zone del mondo. In questo studio, l'85.6% dei ceppi si è rivelato resistente ad almeno un agente antimicrobico; questo dato è oltre il doppio rispetto a quello registrato da altri Autori [Cobb e Stavisky, 2013; Gill *et al.*, 2005]. Il 42.8% dei ceppi testati è risultato resistente contemporaneamente a più antimicrobici e, se confrontato con le resistenze multiple riscontrate in altri studi su campioni di origine non umana, questo dato è in accordo con la bibliografia disponibile (nella regione Marche nel 2012 il 41.8% dei ceppi testati era insensibile a quattro o più farmaci). Tutti i ceppi risultati sensibili a neomicina, norfloxacin e sulfamethoxazolo-trimethoprim, mentre si sono registrati profili intermedi di sensibilità nei confronti di cloramfenicolo, cefotaxime, ciprofloxacina, marbofloxacina, colistina; almeno una resistenza per gentamicina, amoxicillina-acido clavulanico, ampicillina, cefalotina, enrofloxacin, acido nalixico, tetraciclina, ceftazidime, mentre percentuali più elevate di resistenza sono state riscontrate per kanamicina, streptomycin e associazione trisulfamidica. L'86% degli stipiti ha manifestato infatti resistenza all'associazione trisulfamidica, il 71% alla streptomycin ed il 64% alla kanamicina.

Il quadro finora descritto è certamente non trascurabile, soprattutto per le resistenze rilevate nei confronti di farmaci di critica importanza per la terapia delle infezioni nell'uomo e negli animali, soprattutto i chinoloni e cefalosporine: nel nostro caso infatti il 7% dei ceppi è resistente all'enrofloxacin e, per quanto riguarda le cefalosporine, al ceftazidime nel 21.4% dei ceppi.

Anche se il rilievo della resistenza può essere giustificato nei confronti di farmaci di vecchia data, vista la pressione selettiva esercitata da queste molecole sui batteri, l'emergenza di profili di antibiotico-resistenza nei confronti di antimicrobici di recente introduzione nella pratica clinica è un dato assolutamente preoccupante, sia per la mancanza di strumenti terapeutici efficaci, sia in funzione della possibile trasmissione e diffusione di resistenza anche ad altri batteri per via orizzontale.

A tal proposito è importante sottolineare che la resistenza ai chinoloni rilevata in questo studio sembra essere dovuta a mutazioni cromosomiche, mentre non è stata riscontrata la presenza di geni di resistenza a tali molecole a localizzazione plasmidica. Tale aspetto è certamente rassicurante in quanto, a differenza delle prime trasmissibili solo verticalmente all'interno di uno stesso clone, la presenza di determinanti genici a livello di elementi mobili di DNA garantirebbe una possibile diffusione orizzontale delle resistenze anche a batteri di genere e/o specie diversi, amplificando così l'entità del fenomeno.

Per quanto riguarda i campioni di origine ambientale, è importante sottolineare il rilievo di un ceppo di *S. Bredeney*, resistente all'azione di sei antimicrobici, tra cui l'enrofloxacin. Poiché è nota la capacità di *Salmonella* di resistere e diffondere facilmente nell'ambiente, tale rilievo sottolinea l'urgenza di monitorare la presenza di questi batteri potenzialmente patogeni anche in questi contesti, date soprattutto le rilevanti implicazioni sulla salute pubblica che tali patogeni potrebbero causare. Un discorso analogo può essere fatto anche per i cani di proprietà, che si sono mostrati, a loro volta, una possibile fonte di diffusione di *Salmonella* (in alcuni casi caratterizzata da resistenza diffusa agli antimicrobici), soprattutto in virtù dello stretto rapporto e della condivisione degli stessi ambienti che gli animali da compagnia hanno con i loro proprietari. Concludendo, lo studio effettuato evidenzia la circolazione di stiptipi di *Salmonella* nel cane, spesso caratterizzati da profili di antibiotico-resistenza. Tale fenomeno viene considerato dalle principali Organizzazioni, sia a livello europeo che mondiale, una vera e propria emergenza sanitaria, sia in medicina umana che in veterinaria, ed una delle priorità per la salute pubblica. Nonostante i provvedimenti attuati, sono certamente necessarie campagne di sensibilizzazione all'uso razionale di antimicrobici sia tra il personale sanitario che nella popolazione. Oltre a ciò, risulta fondamentale il monitoraggio di questo fenomeno anche nelle popolazioni animali, non necessariamente da reddito e, contemporaneamente, sensibilizzare i proprietari di animali da compagnia nei confronti del problema tramite campagne di educazione volte ad istruire sul potenziale patogeno intrinseco alle deiezioni degli animali nell'ambiente e sulla relativa importanza dell'igiene urbana. In conclusione, a fronte dell'accertato ruolo del cane quale possibile fonte di trasmissione di *Salmonella* spp. all'uomo, è certamente auspicabile l'introduzione di un monitoraggio ufficiale, come per la filiera alimentare, anche in queste specie, visto il ruolo sinantropico che il cane riveste.

## •Bibliografia

- Acha, P.N., Szyfres, B.,** "Salmonellosis" zoonoses and communicable disease common to man and animals. 2001 Vol.1. pp.233-245.
- Adesiyun, A.A.,** Antibiograms of thermophilic *Campylobacter* and *Salmonella* species isolated from stray and pet animals and wildlife on Trinidad. *Vet. Arhiv.* 1999. 69, pp.229-237.
- Ahmed, A.M., Ishida, Y., Shimamoto, T.,** Molecular characterization of antimicrobial resistance in *Salmonella* isolated from animals in Japan. *J. Appl. Microbiol.* 2009 Feb (106)2:402-409 doi: 10.1111/j.1365-2672.2008.04009.
- Anderson, E.S.,** Drug resistance in *Salmonella typhimurium* and its implications. *Brit. Med. J.* 1968,3(5614):333-339.
- Bagcigil, A.F., Ikiz, S., Dokuzeylul, B., Basaran, B., Or, E., Ozgur, N.Y.,** Fecal shedding of *Salmonella* spp. in dogs. *J. Vet. Med. Sci.* 2007. 69(7): 775-777.
- Baldelli, F., Malincarne, L.,** Malattie Infettive. Infezioni da bacilli Gram-negativi aerobi. 2007 pp.107-117.
- Ballarini, G.,** Atti della giornata di studio su: zoonosi ed animali da compagnia. Patologia animale da urbanizzazione e salute umana. Brescia, 27 maggio 1983. Edizione a cura della Fondazione Iniziative Zooprofilattiche e zootecniche-Brescia. Vol.9 pp.11-18 .
- Benini, R.,** Antibiotico-resistenza: siamo consapevoli. Seminario FVE – DGSANCO – PRESIDENZA UE. Bruxelles, 17-18 novembre 2011. 30giorni. pp.10-11.
- Biffi, C.P., Stefani, L.M., Miletto, L.C., Matiello, C.A., Backes, R.G., Almeida, J.M., Neves, G.B.,** Phenotypic and genotypic resistance profiles of *Salmonella Typhimurium* to antimicrobials commonly used in poultry. *Rev. Bras. Cienc. Avic.* 2014. Vol.16 n°2. 213-216.
- Butler, T., Arnold, K., Linti, N., N., Pullock, M.,** Cloramphenicol resistance typhoid fever in Vietnam associated with R factor. *Lancet* 1973, 302(7836) pp.983-985.
- Carattoli, A.,** Resistance plasmid families in Enterobacteriaceae. *Antimicrob. Agents Ch.* 2009, 53: 2227-2230.
- Carter, E.M., Quinn, J.P.,** *Salmonella* infection in dogs and cats, in "Salmonella in domestic animals". Ed. 2000 pp.231-238.
- Cassone, A.,** Forum antibiotico-resistenza. Sistemi di sorveglianza della resistenza ai farmaci antimicrobici. Razionale per la formulazione di un consenso sui criteri. *Notiziario dell'Istituto Superiore di Sanità*, Aprile 2001 vol.14 – n° 4. 11-17.
- Cassone, A., Carinci, A., M.,** Antimicrobici: consapevolezza pubblica e comportamenti, Rapporti ISTISAN 09/32. pp.2-5.
- Cavaco, L.M., Frimodt-Moller, N., Hasman, H., Guardabassi, L., Nielsen, L., Aarestrup, F.M.,** Prevalence of quinolone resistance mechanisms and association to minimum inhibitory concentrations in quinolone-resistant *Escherichiacoli* isolated from humans and swine in Denmark. *Microb. Drug. Resist.* 2008,14 (2):163-169.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC).** National *Salmonella* Surveillance Annual Report — Appendices, 2010. Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services, CDC, 2013
- Cirillo, G., Becchi, M., Camellini, L., Caroli, D., Mercati, G., Molina, M., Moroder, L., Bottinelli, G., Mannuppella, A., Galetta, P.,** III Workshop nazionale Enter-net Italia. Le infezioni gastroenteriche. L'uomo, gli animali, gli alimenti e l'ambiente. Roma, 6-7 novembre 2003. ISTISAN Congressi 03/C5. p.6.
- Cobb, M.A., Stavisky, J.,** "Salmonella in Domestic Animals", *Salmonella Infections in Dog and Cat.* 2°Ed. 2013 pp.318-323, 326-328.
- Corrente, M., Totaro, M., Martella, V., Campolo, M., Lorusso, A., Ricci, M., Buonavoglia, C.,** Reptile-associated Salmonellosis in man. *Emerg. Infect. Dis.* Febbraio 2006. 12(2):358-359
- Darwin, K.H., Miller, V.L.,** Molecular basis of the interaction of *Salmonella* with the intestinal mucosa. *Clin. Microbiol. Rev.* 1999. 12, 405-428.
- Druzhkova, A.S., Thalmann, O., Trfonov, V.A., Leonard, J. A., Vorobieva, N.V., Ovodov, N.D., Graphodatsky, A.S., Wayne, R.K.,** Ancient DNA Analysis Affirms the Canid from Altai as a Primitive Dog. *PLoSOne* 2013. 8 (3):e577e54 pp.1-6.

**Endtz, H.P., Ruijs, G.J., van Klingeren, B., Jansen, W.H., van der Reyden, T., Mouton, R.P.,** Quinolone resistance in *campylobacter* isolated from man and poultry following the introduction of fluorquinolones in veterinary medicine. *J. Antimicrob. Chemoter.* 1991. 27(2): 199-208.

**European Centre for Disease Prevention and Control.** Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2010. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). Stockholm: ECDC; 2011. doi 10.2900/14911.

**European Food and Safety Authority. European Center for Disease Prevention and Control.** European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic agents and Food-borne Outbreaks in 2012. *EFSA Journal* 2014;12(2):3547

**European Food and Safety Authority.** Scientific Report of the Task Force on Zoonoses Data Collection and Statistical analysis of temporal and spatial trends of zoonotic agents in animals and food. *EFSA Journal* 2009

**Farina, R.,** Atti della giornata di studio su: zoonosi ed animali da compagnia. Zoonosi batteriche. Edizione a cura della Fondazione Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche – Brescia – Gennaio 1984. pp. 29, 36-38

**Fukuda, K.,** Antimicrobial resistance: Global Report on Surveillance. Ristampa giugno 2014. pp.1, 4-5, 9-12, 23-25

**Galetta, P., Tozzi, A.E., Lana, S.,** III Workshop nazionale Enter-net Italia. Roma, 6-7 novembre 2003. ISTISAN Congressi 03/C5 Le infezioni gastroenteriche. L'uomo, gli animali, gli alimenti e l'ambiente: nuovi scenari epidemiologici, p.3

**Galton, M.M., Scatterday, J.E., Hardy, A.V.,** Salmonellosis in Dog. *J. Infect. Dis.* 1952. 91, 1-4

**Galli, V.A.,** Microbiologia degli Alimenti. Casa Editrice Ambrosiana 2005. Cap.1

**Gangarosa, E.J., Olarte, J., Hernandez, P.M., Bessudo, M.,** An epidemic-associated episome. *J. Infect. Dis.* 1972. 126: 215-218.

**Gill, N., Reilly, B., Threlfall, J.,** Enter-Net Annual report 2005, DGSANCO Unit C/3, Agreement N°2003203. "Surveillance of Enteric Pathogens in Europe and Beyond". pp-22-30

**Glynn, J.R., Palmer, S.R.,** Incubation period, severity of disease, and infecting dose: evidence from a *Salmonella* outbreak. *Am. J. Epidemiol.* 1992. 136(11)pp.1369–1377.

**Glynn, M.K., Bopp, C.M.S., Dewitt, W., Dabney, P., Mokhtar, M., Angulo, F.,** Emergence of multidrug-resistant *Salmonella* enterica serotype Typhimurium DT 104 infections in the United States. *New. Engl. J. Med.* 1998. Vol.338 n.19

**Grant, S., Olsen, C.W., Grant, S., Olsen, C.W.,** Preventing zoonotic diseases in immunocompromised persons: the role of physicians and veterinarians. *Emerg. Infect. Dis.* 1999. 5(1):159–63

**Graziani, C., Busani, L., Battisti, A., Franco, A., Vio, D., Mancin, M., Di, Giannatale, E., D'Incau, M., Owczarek, S., Luzzi, I.,** Workshop nazionale Enter-net Italia. Sistema di sorveglianza delle infezioni enteriche. Le infezioni gastroenteriche. L'uomo, gli animali, gli alimenti e l'ambiente: nuovi scenari epidemiologici. Istituto Superiore di Sanità. Roma, 6-7 novembre 2003. Roma. *ISTISAN Congressi 03/C5.* p.9

**Graziani, C., Galetta, P., Busani, L., Dionisi, A.M., Filetici, E., Ricci, A., Caprioli, A., Luzzi, I.,** Infezioni da *Salmonella*: diagnostica, epidemiologia e sorveglianza. *Rapporti ISTISAN 05/27.* pp. 12, 28

**Herris, J.R., Bergmire-Sweat, D., Schlegel, J.H., Wimpfing, K. A., Klos, R.F., Perry, C., Tauxe, R.V., Sotir, M.J.,** Multistate outbreak of *Salmonella* Infections Associated With Small Turtle Exposure, 2007-2008. *J. Am. Acad. Pediat.* 2009. Vol.124 N°5 novembre 2009. 1388-1392

**Hoelzer, K., Switt, M.A.I., Wiedmann, M.,** Animal contact as a source of human non-typhoidal salmonellosis. *Vet. Res.* 2011. 14:42:34. pp.1,9-12

**Hopkins, K.L., Wootton, L., Day, M.R., Threlfall, E.J.,** Plasmid mediated quinolone resistance determinant qnrS1 found in *Salmonella* enterica strains isolated in the UK. *J. Antimicrob. Chemoter.* 2007 Jun;59(6):1071-5. Epub 2007 Apr 12

**Issenhuth-Jeaniean, S., Roggentin, P., Mikoleit, M., Guidourbenche, M., de Pinna, E., Nair S., Fields, P.I., Weill, F.X.,** Supplement 2008-2010 (no. 48) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. *J. Res. Microbiol.* 2014. 165(7):526-30

- Izumiya, H., Mori, K., Kurazono, T., Yamaguchi, M., Higashide, M., Konishi, N., Kai, A., Morita, K., Terajima, J., Watanabe, H.**, Characterization of isolates of *Salmonella* enterica Serovar Typhimurium displaying high level fluorquinolone resistance in Japan. *J. Clin. Microbiol.* 2005. 43(10):5074-5079
- Kim, H.B., Wang, M., Park, C.H., Kim, E.C., Jacoby, G.A., Hooper, D.C.**, *oqxAB* encoding a multidrug efflux pump in human clinical isolates of *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob. Agents Ch.* 2009 53(8):3582-3584
- Knight-Jones, T.J., Mylrea, G.E., Kahn, S.**, Animal production food safety: priority pathogens for standard setting by the World Organisation for Animal Health. *Rev. Sci. Tec. OIE.* 2010. vol.29, n.3, 523-535
- Krag, E.**, The Copenhagen Recommendations, Report from the Invitational EU Conference on The Microbial Threat. Copenhagen, 9-10 settembre 1998. Edited by: Vibeke Thamdorp Rosdahl, Division Director, Statens Serum Institut and Knud Børge Pedersen, Director, Danish Veterinary Laboratory pp.1-8. 1998
- Kwaga, J.K.P., Adesiyun, A.A., Abdullahi, S.U., and Bello, C.S.S.**, Prevalence of *Salmonellae*, *Shigellae* and *Plesiomonas shigelloides* in dogs in Zaria, Nigeria. *Brit. Vet. J.* 145(2)marzo-aprile1989, pp.174-177
- Lenski, R.E.**, Bacterial evolution and the cost of antibiotic resistance. *Int. Microbiol.* 1998. 1(4):265-70
- Leonard, E.K., K., Pearl, D.L., Finley, R.L., Janecko, N., Peregrine, A.S., Reid-Smith, R.J., and Weese, J.S.**, Evaluation of pet-related management factors and the risk of *Salmonella* spp. carriage in pet dogs from volunteer households in Ontario (2005-2006). *Zoonoses and Public Health* 2011. 58(2):140-149
- Luzzi, I.**, Malattie trasmesse da alimenti (MTA): la sorveglianza nazionale ed europea. Convegno "La Prevenzione delle Malattie Trasmesse con gli Alimenti" Feroletto Antico, 13-15 marzo 2013
- Madewell, B.R., McChesney, A.E.**, Salmonellosis in a human infant, a cat, and two parakeets in the same household. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1975. 167, pp.1089-1090
- Mancini, L., Marcheggiani, S., D'Angelo, A., Puccinelli, C., Chiudioni F., Rossi, F., Delibato, E., De Medici, D., Dionisi, A.M., Owczarek, S., Luzzi, I.**, First isolation of *Salmonella* enterica serovar Napoli from wild birds in Italy. *Annali ISS* 2014. 50(1): 96
- Mantovani, A.**, Atti della giornata di studio su: zoonosi ed animali da compagnia. . Edizione a cura della Fondazione Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche – Brescia – Gennaio 1984. pp.115-116
- Martinez, E., de la Cruz, F.**, Genetic elements involved in Tn21 site-specific integration, a novel mechanism for the dissemination of antibiotic resistance genes. *EMBO Journal* 1990. 9:1275-1281
- Melis, M.**, Additivi e tossici negli alimenti. Libreriauniversitaria.it Edizioni. Ed.13. 2014. p.691
- Miller, S.I., Hohmann, E.L., Pegues, D.A.**, Principles and practice of infectious diseases vol.2 ed. *Elsevier*, 4°Ed. 1995, pp.2013-2028.
- Monzeglio, M. G.**, Ubiquitari i geni dell'antibiotico-resistenza. *Vet. Journal.* 12 maggio 2014 Editore ev srl.
- Morse, E.V., Duncan, M.A., Estep, D.A., Riggs, W.A., Blackburn, B.O.**, Canine salmonellosis: a review and report of dog to child transmission of *Salmonella* Enteritidis. *Am. J. Public Health* 1976. 66(1):82-84
- Morse, E.V., Duncan, M.A.**, Canine Salmonellosis: Prevalence, Epizootiology, Signs and Public Health Significance. *Journal of American Veterinary Medical Association* 1975. 167(9):817-820
- Muresu, E., Rubino S., Piana A., Are, B.M. , El-Kammsh, S., Kazmi, S., Maida, I., Azara, A.**, III Workshop nazionale Enter-net Italia. Le infezioni gastroenteriche. L'uomo, gli animali, gli alimenti e l'ambiente: nuovi scenari epidemiologici. . Istituto Superiore di Sanità. Roma, 6-7 novembre 2003. Roma. *ISTISAN Congressi* 03/C5 p.30
- Murphy, C., Reid-Smith, R.J., Prescott, J.F., Bonnett, B.N., Poppe, C., Boerlin, P., Weese, J.S., Janecko, N., and McEwen, S.A.** Occurrence of antimicrobial resistant bacteria in healthy dogs and cats presented to private veterinary hospitals in southern Ontario: a preliminary study. *Can. Vet. J.* 2009. 50(10):1047-1053
- Nastasi, A.**, III Workshop nazionale Enter-net Italia. Le infezioni gastroenteriche. L'uomo, gli animali, gli alimenti e l'ambiente: nuovi scenari epidemiologici. Istituto Superiore di Sanità. Roma, 6-7 novembre 2003. Roma. *ISTISAN Congressi* 03/C5 p.15



- Nastasi, A., Massenti, M.F., Scarlate, G., Mammina, C., Calco, C., and Villafrate, M.R.,** *Salmonella* and *Yersinia enterocolitica* in soil and dog faeces. *Bollettino dell'Istituto Sieroterapico Milanese* 1986. 65(2):150–152
- Nesme, J., Cécillon, S., Delmont, T.O., Monier, J., Vogel, T.M., Simonet, P.,** Large-Scale metagenomic-Based Study of Antibiotic Resistance in the Environment. *Curr. Biol.* 19 May 2014. 24(10):1096-1100
- Orosz, S.E., Chengappa, M.M., Oyster, R.A., Morris, P.J., Trock, S., Altekruze, S.,** *Salmonella* enteritidis infection in two species of psittaciformes. *Avian. Dis. J.* 36(3):1-2. 1957
- Pallo-Zimmermann, L.M., Byron, J.K., Graves, T.K.,** Fluorquinolones: then and now. *Compend. Contin. Educ. Vet.* 2010, 32(7):E1-9
- Paltansing, S., Kraakman, M.E.M., Ras, J.M.C., Wessels, E., Bernards, A.T.,** Characterization of fluoroquinolone and cephalosporin resistance mechanisms in *Enterobacteriaceae* isolated in a Dutch teaching hospital reveals the presence of an *Escherichiacoli* ST131 clone with a specific mutation in parE. *Antimicrob. Chemother.* 2013. 68(1):40–45
- Pantosi, A., Del Grosso, M.,** *Rapporti ISTISAN 09/32*, Giornata europea degli antimicrobici: uso responsabile per il controllo dell'antibiotico-resistenza. pp.1-10, 12-17, 21-24, 27- 32, 36-37, 39, 42
- Paton, J.H., Reeves, D.S.,** Fluorquinolone antibiotics. *Microbiology, pharmacokinetics and clinical use of Drugs*, 1998. 36: 193-228
- Plaut, M., Zimmerman, E.M., Goldstein, R.A.,** Health hazards to human associated with domestic pet. *Annu. Rev. Pub. Health* 1996. pp.221-245
- Poli, G., Cocilovo, A., Dall'Ara, P., Martino, P.A., Ponti, W.,** *Microbiologia e immunologia veterinaria* UTET, 2°Ed.2005 pp. 3-5, 9-11,200, 222-223
- Pontello, M. e Coll.,** Frequenze e chemio-antibiotico resistenze di sierotipi di *Salmonella* non umani, *Giorn. Batt. Virol. Immunol.* 1982. pp.75, 135.
- Poppe, C., Smart, N., Khakhria, R., Johnson, W., Spika, J., Prescott, J.,** *Salmonella* typhimurium DT104: a virulent and drug-resistance pathogen. *Can. Vet. J.* 39(9):559-565
- Reynolds, P.J.A.,** *Epidemiological Bulletin* 18:35-37. 1974
- Robicsek, A., Strahilevitz, J., Jacoby, G.A., Macielag, M., Abbanat, D., Park, C.H., Bush, K., Hooper, D.C.** Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. *Nat. Med.* 2006. 12(1):83-88
- Romero, E., Molina, A. M.,** La multiresistenza infettiva ai farmaci antibatterici. Osservazioni su un campione di 98 stiptipi di *S. Typhimurium* isolati da casi di gastroenterite. *Atti XIV Congresso Nazionale Microbiologia* Messina, 1967. pp. 495-509
- Rondanelli, E.G., Fabbi, M., Marone, P.,** *Trattato sulle infezioni e tossinfezioni alimentari*, Ed. *Selecta Medica*. Pavia 2005
- Rosdal, V.T.,** The Copenhagen Recommendations. Report from the Invitational EU Conference on The Microbial Threat. Copenhagen, 9-10 settembre 1998. Edited by: Vibeke Thamdrupe Rosdahl, Division Director, Statens Serum Institut and Knud Børge Pedersen, Director, Danish Veterinary Laboratory pp.1-8
- Ryan, M.P., Dillon, C., Adley, C.C.,** Nalixic-acid resistant strains of *Salmonella* showing decreased susceptibility to fluorquinolones in the Midwestern region of the Republic of Ireland due to mutations in the *gyrA* gene. *J Clin Microbiol* 2011. Vol. 49(5):2077-2079
- Sala, M., Malandrucchio, L., Binkin, N., Battisti, A.,** *Attitudine all'uso prudente degli antimicrobici e percezione del rischio di antibiotico-resistenza: un'indagine campionaria tra veterinari clinici dei piccoli animali.* *Not. Ist. Super. Sanità* 2006;19(3):i-ii
- Sali, G.,** Daniel Elmer Salmon: lo scopritore delle Salmonelle e fondatore del Servizio Veterinario degli Stati Uniti. *Praxis Veterinaria, Ed. Le Point Veterinaire Italie.* Vol.XX N.2/1999 pp.30-31
- Salmaso, S., D'Ancona, F. P., Alfonsi, V.,** Ruolo dell'ECDC nella sorveglianza e controllo delle emergenze infettive in Europa. In: *Giornata europea degli antibiotici: uso responsabile per il controllo dell'antibiotico-resistenza.* A cura di A Pantosti e M Del Grosso. *Rapporti ISTISAN 09/32:* p.10-4

- Sanchez, S., Hofacre, C.L, Lee, M.D., Maurer, J.J., Doyle, M.P.,** Animal sources of salmonellosis in humans. *J. Am. Vet. Med. Ass.* 2002. 221: 492-497
- Sanderson, K. E., Nair, S.,** "Taxonomy and Species concepts in the Genus *Salmonella*." In *Salmonella in Domestic Animals*, 2°Ed.FSC 2013. pp.1-3
- Sato, Y. , Mori, T., Koyama, T., Nagase, H.,** *Salmonella* Virchow infection in a infant transmitted by household dogs. *J. Vet. Med. Sci.* 2000. 62(7):767-769
- Schito, C. G.,** Atti del convegno nazionale su: Le salmonellosi in Italia. Roma, Istituto Superiore di Sanità, 29-30 aprile 1976. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanità (1977) 13*, pp. 523-536
- Schnieder, F., Wannet, W., Machado, J., Edwards, G.,** Antimicrobial drug resistance in isolates of *Salmonella* enterica from cases of salmonellosis in humans in Europe in 2000: result of International multi-center. *Euro. Surveill.* 2003.8(2):14-45.
- Scuderi, G.,** A review of the Salmonellosis surveillance system in Italy: evolution during the course of time within the International framework. *Eur. J. Epidemiol.* 2000. 16(9):861-868
- Seepersadsingh, N., Adesiyun, A.A., and Seebaransingh, R.,** Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* spp. in non-diarrhoeic dogs in Trinidad. *J Vet Med* 2004. Series B 51, 337–342
- Staffolani, M., Striano, G., Perugini, G., Fisichella, S.,** Analisi della diffusione di geni di resistenza antibiotica di *Salmonella* enterica sierotipo Typhimurium fagotipo DT104 e fagotipi correlati mediante un saggio di PCR multiplex. Webzine Sanità Pubblica Veterinaria - Numero 30, maggio-giugno 2005; pp.1-3
- Sterzenbach, T., Crawford, R.W., Winter, S.E., Baumler, A.J.,** *Salmonella* in Domestic Animals, 2° Ed. 2013, *Salmonella* Virulence Mechanism and their genetic basis. pp.80-82
- Stevens, M.P, Humphrey, T.J., Maskell, D.J.,** Philosophical Transactions of the Royal Society , Molecular insights into farm animal and zoonotic *Salmonella* infections. *Philos. Trans. R. Soc Lond. B. Biol. Sci.* 2009. 364(1530):2709-2723
- Stucker, C.L., Galton, M.M., Cowdery, J., and Hardy, A.V.,** Salmonellosis in dogs. *J. Infect. Dis.* 1952. 91:6–11
- Tamiazzo, C.,** Studio sulla prevalenza di *Salmonella* spp. in cani veneti di proprietà e valutazione dei fattori di rischio. Teso di Laurea. Relatore Drigo M., Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute, Scuola di Agraria e Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Padova, Legnaro. 2010
- Tanaka, Y., Katsube, Y., Imaizumi, K.,** Experimental carrier in dogs produced by oral administration of *S. Typhimurium*. *Jap. J. Vet. Sci.* 1976. pp.38, 569
- Tauxe, R.V., Pavia, A.T.,** Bacterial infection of humans: epidemiology and control, 3°Ed. *Plenum Medical Book Co.,* New York 1998. pp.223-242
- Thomas, C.M., Nielsen, K.M.** Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* 2005. 3:711-21
- Threlfall, E.J, Fisher, I.S., Berghold, C., Gerner-Smidt, P., Tschape, H., Cormican, M., Luzzi, I., Schnieder, F, Wannet, W., Machado, J., Edwards, G.,** Antimicrobial drug resistance in isolates of *Salmonella* enterica from cases of salmonellosis in humans in Europe in 2000: results of international multi-centre surveillance. *Euro. Surveill.* 2003;8(2):41-5.
- Threlfall, E.J., Frost, A., Ward, L.R., Rowe, B.,** Epidemic in cattle and humans in *Salmonella* typhimurium DT104 with chromosomally integrated multiple antibiotic resistance. *Vet. Rec.* 1994;134: 577
- Tsai, H.J., Huang, H.C., Lin, C.M., Lien, Y.Y., and Chou, C.H.,** *Salmonellae* and *Campylobacters* in household and stray dogs in Northern Taiwan. *Vet. Res. Commun.* 2007. 31, 931–939
- Vannugli, R.,** Atti del Convegno Nazionale su: Le Salmonellosi in Italia, Roma, Istituto Superiore di Sanità, 29.30 aprile 1976. pp.507-5012
- Wang, M., Guo, Q., Xu, X., Wang, X., Ye, X., Wu, S., Hooper, D.C., Wang, M.,** New plasmid-mediated quinolone resistance gene, qnrC, found in a clinical isolate of *Proteus mirabilis*. *Antimicrob. Agents Ch.* 2009. 53:1892-1897
- Watanabe, T.,** Infective heredity of multiple drug resistance in bacteris. *Bacteriol. Rev.* 1963, 27:87-115

**Weber, A., Wachowitz, R., Weigl, U., and Schäfer-Schmidt, R.,** Occurrence of *Salmonella* in fecal samples of dogs and cats in northern Bavaria from 1975 to 1994. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift* 1995.108, 401–404

**Wieler, L.H., Ewers, C., Guenther, S., Walther, B., Lubke-Becker, A.,** Methicillin-resistant staphylococci (MRS) and extended-spectrum beta-lactamases (ESBL)-producing Enterobacteriaceae in companion animals: nosocomial infections as one reason for the rising prevalence of these potential zoonotic pathogens in clinical samples. *Int. J. Med. Microbiol.* 2011. 301. &35-641

**Wright, G.D.,** Bacterial resistance to antibiotics: enzymatic degradation and modification. *Adv. Drug. Deliver. Rev.* 57(2005) pp.1451-1470

**Wright, J.G., Tengensen, L.A., Smith, K.E., Bender, J.B., Frank, R.K., Grendon, J.H., Rice, DD.H., Thieesen, A.M.B., Gilbertson, J.C., Sivapalasingam, S., Barret, T.J., Besser, E.T., Hancock, D.D., Angulo, F.J.,** Multidrug-resistance *Salmonella* Typhimurium in four animal facilities. *Emerg. Infect. Dis.* 2005. 11:1235-1241

**Zavanella, M.,** Tipizzare le Salmonelle, Edizione Fondazione iniziative zooprofilattiche e zootecniche – Brescia-.49-2001. pp. 9; 13-15

**Zavanella, M. e Coll.,** Antibiotico-resistenza di ceppi *Salmonella* isolati da animali e da alimenti di origine animale, *Nuova Vet.* 1973. 49,2

- **Webgrafia**

<http://eurispes.eu/content/animali-domestici-quasi-il-42-degli-italiani-ne-possiede-uno>

<http://www.agenziafarmaco.gov.it/it/content/al-la-terza-edizione-della-campagna-di-comunicazione-dellaifa-antimicrobici-difendi-la-tua-dif>

<http://www.agenziafarmaco.gov.it/it/content/storia-dei-farmaci-la-scoperta-degli-antimicrobici>[http://qs1439.pair.com/michaelz/repository/microbiologia/modulo\\_0/unit\\_3/sco\\_3/text.html](http://qs1439.pair.com/michaelz/repository/microbiologia/modulo_0/unit_3/sco_3/text.html)

<http://www.blv.admin.ch/themen/02794/02896/index.html?lang=i>

<http://www.ecdc.europa.eu/en/eaad/Documents/EARS-Net-summary.pdf>

[http://www.ecdc.europa.eu/en/healthtopics/food\\_and\\_waterborne\\_disease/Documents/Zoonose%202014\\_SCREEN.pdf](http://www.ecdc.europa.eu/en/healthtopics/food_and_waterborne_disease/Documents/Zoonose%202014_SCREEN.pdf)

<http://www.efsa.europa.eu/it/topics/topic/Salmonella.htm>

<http://www.efsa.europa.eu/it/topics/topic/zoonoticdiseases.htm>

<http://www.epicentro.iss.it/problemi/Salmonella/epid.asp>

<http://www.ilfattoquotidiano.it/2013/02/04/antimicrobici-scoperta-molecola-per-combattere-lantibiotico-resistenza/488698/>

[http://www.quotidianosanita.it/scienza-e-farmaci/articolo.php?articolo\\_id=18213](http://www.quotidianosanita.it/scienza-e-farmaci/articolo.php?articolo_id=18213)

<http://www.sivempveneto.it/vedi-tutte/4691-principali-sierotipi-Salmonella-dati-raccolti-a-livello-nazionale-rete-di-sorveglianza-enter-vet>

[http://www.who.int/gfn/publications/strategic\\_plan\\_2011/en/](http://www.who.int/gfn/publications/strategic_plan_2011/en/)

[http://www.who.int/gho/mortality\\_burden\\_disease/en/](http://www.who.int/gho/mortality_burden_disease/en/)

<https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/portal/?event=searchResultLis>

<http://www.who.int/gfn/links/en/>

