

**PREVALENZA, ANTIBIOTICO-RESISTENZA E
CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DI CEPPI DI
SALMONELLA ENTERICA SEROVAR 4,[5], 12:i:-
ISOLATA DA SUINI AL MACELLO E DA CAMPIONI PATOLOGICI**

**PREVALENCE, ANTIMICROBIAL RESISTANCE AND MOLECULAR
CHARACTERIZATION OF SALMONELLA ENTERICA SUBSP.
ENTERICA SEROVAR 4,[5], 12:i:-
ISOLATED FROM SLAUGHTERED PIGS AND
PATHOLOGICAL SAMPLES**

ROSAMILIA A., CARRA E., BONILAURI P., GHERPELLI Y., CORPUS F.,
MORGANTI M., RUGNA G., ROSIGNOLI C., NIGRELLI A., D'INCAU M.,
BIASI G., DOTTORI M., MERIALDI G., LUPPI A.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna (IZSLER)

Parole chiave: *Salmonella*, suini, prevalenza, antibiotico-resistenza, PFGE, MLVA

Key Words: *Salmonella*, pigs, prevalence, antibiotic resistance, PFGE, MLVA

Riassunto. Da Febbraio a Novembre 2013, 41 partite di suini regolarmente macellati, provenienti da altrettanti allevamenti del Nord Italia sono state campionate attraverso il prelievo di linfonodi ileocecali (30 suini per partita), per un totale di 1230 suini campionati. *Salmonella spp.* è stata isolata nel 18,78% dei suini macellati e 21 sierotipi sono stati identificati. *S. 4,[5],12:i:-* è risultato il sierotipo maggiormente isolato (4,47%), seguito dalla *S. Rissen* (3,25%) e *S. Derby* (2,68%) mentre *S. Typhimurium* ha presentato una prevalenza al macello soltanto dello 0,74%.

Novantaquattro ceppi di *S. 4,[5],12:i:-* (55 isolati dal precedente campionamento al macello e 39 isolati da campioni patologici provenienti da 30 allevamenti) sono stati testati per valutare la loro sensibilità nei confronti di 14 antibiotici. Il 90,42% degli isolati è risultato essere multiresistente evidenziando la circolazione di due fenotipi prevalenti: ASSuT (48,9% dei ceppi) ed ACSSuT (41,5% dei ceppi).

Due metodiche di genotipizzazione batterica sono state applicate per valutare la diversità genetica dei ceppi di *S. 4,[5],12:i:-* appartenenti ai due gruppi (macello e allevamento): il metodo Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) e il metodo Multi-Locus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis (MLVA). La PFGE ha individuato 40 differenti genotipi, mentre la metodica MLVA ne ha individuati 28. Combinando insieme i diversi profili ottenuti dalle due metodiche il potere discriminante aumenta in modo significativo (Indice di Diversità di Simpson 0,97 $p < 0.001$). I risultati del nostro studio confermano l'alta prevalenza di *Salmonella spp.* nei suini macellati e sottolineano l'elevata incidenza della *S. 4,[5],12:i:-* che si conferma come sierotipo preponderante. I dati di antibiotico-resistenza ottenuti dai ceppi di *S. 4,[5],12:i:-* evidenziano la circolazione di due principali profili fenotipici di multi resistenza (ASSuT ed ACSSuT).

Abstract. From February to November 2013, 1230 ileocolic lymph nodes were randomly collected from heavy pigs (9-10 months old, 160 kg BW) belonging to 41 batches coming from as many herds.

Salmonella spp. was isolated from 231 out of 1230 lymph nodes (18,78% CI95% 16,60%-20,96%) and 38 batches out of 41 were positive. A total of 21 different serovars of *Salmonella*

were identified. *S.* 4,[5],12:i:- was the most prevalent serovar (4,47%) followed by *S.* Rissen (3,25%) and *S.* Derby (2,68%) while *S.* Typhimurium showed a prevalence of 0,74%. Fifty-five strains of *S.* 4,[5],12:i:- isolated during the survey at the slaughterhouse and 39 strains of *S.* 4,[5],12:i:- isolated from clinical pigs were tested for their susceptibility to 14 antimicrobials. All strains of *S.* 4,[5],12:i:- showed resistance to at least one antimicrobial and 90,42% of them showed multiresistance (resistance to 4 or more antibiotics). The most common pattern of resistance profile was the ASSuT profile (48,9% of strains) followed by the ACSSuT profile (41,5% of strains). Strains were characterized by Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) and Multi-Locus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis (MLVA). PFGE analysis generated 40 different profiles while MLVA showed 28 different profiles. Combining the two methods the discriminatory power increased (Simpson's index of diversity 0,97 $p < 0,001$). The combination of different molecular methods can be valuable to characterize *Salmonella* strains and to investigate their epidemiological relationship. The prevalence of *Salmonella* serovars in this study showed an overall decline of serovar Typhimurium. To some extent this reduction has been counteracted by an increase in prevalence of the emerging serovar 4,[5],12:i:-, characterized by isolates with multidrug resistance (ASSuT and ACSSuT profiles) as described in several European countries.

INTRODUZIONE

L'infezione da *Salmonella* rappresenta una delle principali cause di tossinfezione alimentare nell'uomo (EFSA, 2012) e gli alimenti di origine animale, compresi quelli di origine suina (Pires et al., 2011) sono ritenuti responsabili di circa il 10-20% dei casi di salmonellosi nell'uomo (EFSA, 2010). Pertanto una migliore conoscenza della prevalenza di *Salmonella* nel comparto suinicolo inteso il più possibile nella sua interezza, dall'allevamento alla macellazione, fino al prodotto finito pronto all'acquisto ed al consumo, può contribuire a meglio impostare programmi di riduzione del rischio associato al consumo dei prodotti di origine suina e contribuire in modo determinante ad una maggiore sicurezza in termini di salute pubblica. Con il Regolamento (CE) n. 2160/2003 si richiede agli stati membri di stabilire programmi di controllo nazionali, mirati ad una riduzione della prevalenza dell'infezione da *Salmonella* e altri agenti zoonotici in diverse specie animali, tra cui il suino, indicando come punto di intervento principale la produzione primaria. Paesi come la Danimarca, l'Inghilterra, l'Olanda e la Germania hanno stabilito piani di controllo nazionali riguardanti l'infezione da *Salmonella* nel suino, mentre altri Paesi, inclusa l'Italia, sono nella fase di raccolta dati ed informazioni relative all'epidemiologia dell'infezione. Le peculiarità che caratterizzano l'allevamento suino italiano, come l'utilizzo di grandi quantità di alimentazione liquida e la durata del periodo di ingrasso maggiore rispetto a quello osservato negli altri Stati europei, rappresenta un importante fattore di rischio, confermato anche dai dati riportati dall'EFSA, dove si osserva una maggiore percentuale di suini portatori del germe all'età di macellazione in Italia (16,5%) rispetto a quello che si può osservare per gli altri Stati europei (10,3%) (EFSA, 2008).

Fin dalla metà degli anni '90 si è osservata la presenza del sierotipo *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sierotipo 4,[5],12:i:- nota come variante monofasica di *Salmonella* Typhimurium, perché non esprime l'antigene flagellare H di fase due e la sua frequenza di isolamento è via via aumentata fino ai giorni attuali sia in campioni clinici umani che in una vasta gamma di specie animali allevati ed in alimenti di origine animale. In Europa, il pericolo costituito dalla variante monofasica è principalmente associato al consumo di carne di maiale contaminato,

anche se altre sorgenti quali alimenti di origine avicola o bovina e la convivenza con animali da compagnia sono stati riportati tra le sorgenti di questo particolare sierotipo (Hauser et al., 2010). In Italia ed in particolare in Emilia Romagna dove è presente un sistema di sorveglianza regionale sulle salmonellosi umane, il sierotipo più frequentemente isolato dal 2012 è divenuto la variante monofasica, che ha abbondantemente superato per frequenza la *S. Typhimurium* e la *S. Enteritidis*.

A quanto appena esposto si aggiunga che la frequenza con la quale si verificano fenomeni di antibiotico-resistenza fra ceppi di *Salmonella* spp., come dimostrato in Europa, Nord America ed Asia ha subito nel corso degli ultimi anni un drammatico incremento (Graziani et al., 2008; Hopkins et al., 2010; Hur et al., 2011). Infatti, nell'ultima decade si è registrato un aumento globale dell'antibiotico-resistenza nei confronti di molecole come l'ampicillina (A), la streptomina (S), i sulfamidici (Su) e la tetraciclina (T) (ASSuT) in salmonelle di rilevanza clinica per l'uomo, quali *S. 4,[5],12:i:-*, *S. Typhimurium*, e *S. Rissen* (Alcaline et al., 2007; Antunes et al., 2011; EFSA, 2013; Hauser et al., 2010; Meakins et al., 2008). In numerosi Paesi europei, tra cui la Spagna, l'Inghilterra, il Galles, la Germania, la Francia e anche l'Italia, studi su ceppi di *S. Typhimurium* e *S. 4,[5],12:i:-*, hanno evidenziato un'alta prevalenza di ceppi presentanti il profilo di resistenza ASSuT (ceppi tetra resistenti) (Dionisi et al., 2009; Hopkins et al., 2010).

I determinanti genetici della resistenza agli antibiotici sono ad oggi noti ed è possibile confermarne la presenza nei ceppi fenotipicamente rilevati come resistenti ad uno o più determinati agenti antimicrobici. Inoltre, la tipizzazione molecolare dei ceppi di *Salmonella* isolati sia in sede di macellazione che in campioni provenienti dalla produzione primaria e raccolti in allevamento risulta ad oggi possibile tramite tecniche di genotipizzazione batterica quali la Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) e la Multi-Locus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis (MLVA). In termini pratici queste metodiche forniscono informazioni per impostare studi di epidemiologia molecolare in grado di aiutare la comprensione da dove e come il suino entra in contatto con il germe durante la sua vita produttiva che termina con la macellazione.

In quest'ottica rientra il lavoro che andiamo qui a presentare e che ha tra gli obiettivi primari quello di contribuire alla raccolta dati nazionale rivolta alla stima della reale prevalenza dei sierotipi di *Salmonella* in suini italiani all'età di macellazione con particolare riferimento alla variante monofasica. Nel presente lavoro saranno presentati i risultati di un anno di monitoraggio al macello volto al rilevamento di *Salmonella* da linfonodi di suini regolarmente macellati. Inoltre verranno presentati i risultati ottenuti dalla genotipizzazione e valutazione dei pattern di resistenza antibiotica sui ceppi sierotipizzati come varianti monofasiche *S. 4,[5],12:i:-*.

Infine presenteremo i risultati della comparazione genetica e fenotipica (in termini di resistenza agli antimicrobici) tra i ceppi di variante monofasica isolati in sede di macellazione e da campioni biologici provenienti dalla produzione primaria.

MATERIALI E METODI

Campionamento

Da Febbraio a Novembre 2013, 41 partite di suini regolarmente macellati, provenienti da altrettanti allevamenti del Nord Italia sono state campionate attraverso il prelievo di linfonodi ileocecali (30 suini per partita), per un totale di 1230 suini campionati. Ogni partita risultava composta da circa 135 suini (160-170 kg di peso corporeo) di 9-10 mesi d'età. I campioni

una volta prelevati sono stati trasportati alla Sezione di Reggio Emilia (IZSLER) dove sono stati sottoposti ad indagine microbiologica per la ricerca di *Salmonella* spp.

Nello stesso periodo di riferimento, lo studio è stato integrato dalla raccolta di ceppi di *S.* 4,[5],12:i:- isolati da materiale patologico (intestino e feci) proveniente da suini di età compresa tra i 28 giorni ed i 4 mesi appartenenti a 30 allevamenti della medesima area geografica.

Isolamento batterico

Per l'isolamento di *Salmonella* spp. sia dai linfonodi ileocecali prelevati al macello che dai campioni biologici provenienti dalla produzione primaria è stata utilizzata la procedura ISO 6579:2002/Amd 1 Annex D:2007 (ISO, 2007). Per quanto riguarda i campioni di linfonodi questi sono stati processati come riportato da Mainar-Jaime et al. (2012). Brevemente, i linfonodi sono stati decontaminati esternamente previa immersione in alcool assoluto, flambati e frantumati, dopo di che 10 grammi di campione sono stati diluiti 1:10 in acqua peptonata tamponata (APT). Per quel che riguarda campioni fecali o di visceri di suino provenienti dalla produzione primaria, un grammo di feci o di visceri è stato posto in arricchimento con 10 ml di APT. Dopo l'arricchimento primario a $37^{\circ}\text{C} \pm 1$ per 18 ± 2 ore, in entrambi i casi 0,1 ml di brodocoltura è stato trasferito su terreno semisolido Modifield Semisolid Rappaport-Vassillidis (MRSV) e incubate a $41.5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ per 24 ± 3 ore. Le piastre negative di MRSV sono state lasciate ad incubare per ulteriori 24 ± 3 ore. Un'ansata della presunta crescita di *Salmonella* è stata trasferita in due differenti terreni selettivi, Xylose-Lysine-Deoxycholate agar (XLD) e Brilliant Green agar (BGA), e incubate a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ per 24 ± 3 ore. Le colonie presentanti morfologia compatibile con *Salmonella* sono state sottoposte a conferma biochimica e successivamente sierotipizzate.

Tipizzazione Sierologica

La caratterizzazione sierologica dei ceppi di *Salmonella* spp. è stata eseguita mediante agglutinazione rapida su vetrino per la determinazione degli antigeni somatici (O), mentre per la determinazione degli antigeni flagellari (H) è stato applicato il metodo di agglutinazione lenta a caldo secondo la tecnica Spicer (1956), modificata da Edwards (1962) e Morris et al. (1972). Gli esiti delle determinazioni degli antigeni sono stati poi impiegati per la caratterizzazione sierologica definitiva per la quale è stato utilizzato lo schema di Kauffmann-White-Le Minor (Grimont and Weill, 2007).

Test di sensibilità agli antimicrobici

I ceppi di *S.* 4,[5],12:i:- appartenenti ai due gruppi (macello e allevamento) sono stati testati per la sensibilità antimicrobica. Quest'ultima è stata determinata valutando la Minima Concentrazione Inibente (MIC) con il metodo della microdiluzione in piastra, utilizzando un prodotto commerciale (SensitreÒ, TREK Diagnostic Systems Inc). Gli antibiotici testati con i rispettivi *ranges* di diluizione sono stati i seguenti: ampicillina (A), 0,5-32 mg/ml; cloramfenicolo (C), 2-64 mg/ml; streptomina (S), 2-128 mg/ml; sulfametossazolo (Su), 8-1024 mg/ml; tetraciclina (T), 1-64 mg/ml; gentamicina (GEN), 0,25-32 mg/ml; florfenicolo (FFN), 2-64 mg/ml; kanamicina (KAN), 4-128 mg/ml; trimetoprim (TMP), 0,5-32 mg/ml; acido nalidixico (NAL), 4-64 mg/ml; colistina (COL), 2-4 mg/ml; cefotaxime (FOT), 0,06-4 mg/ml; ceftazidime (TAZ), 0,25-16 mg/ml; ciprofloxacina (CIP), 0,008-8 mg/ml. Gli isolati sono stati classificati come resistenti (R), sensibili (S) e intermedi (I) agli antimicrobici in accordo con i *breakpoints* proposti dal Clinical and Laboratory Standards Institute (2008) e dal Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie

(2013). Nella valutazione dei pattern di resistenza i ceppi che hanno fornito un risultato intermedio ad una determinata molecola sono stati raggruppati tra gli isolati sensibili a quella particolare molecola. Controlli di qualità sono stati eseguiti impiegando due ceppi batterici di referenza: *Escherichia Coli* (ATCC 25922) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923).

Caratterizzazione molecolare mediante PFGE e MLVA di ceppi di S. 4,[5],12:i-

Due metodiche di genotipizzazione batterica sono state applicate per valutare la diversità genetica dei 94 stipti di *S. 4,[5],12:i-* appartenenti ai due gruppi (macello e allevamento): il metodo PFGE e il metodo MLVA.

La PFGE è stata eseguita con l'enzima di restrizione Xba-I secondo il protocollo standard adottato da PulseNet (<http://www.pulsenetinternational.org/SiteCollectionDocuments/pfge/>). Ad ogni seduta di ceppi da esaminare è stato incluso nell'analisi il ceppo di riferimento *Salmonella* Braenderup H9812 come controllo. Al termine dell'analisi l'immagine del gel ottenuto era sottoposta ad analisi con il Software BioNumerics versione 6.6. A ciascun ceppo è stato attribuito un genotipo PFGE identificato da un codice specifico per il profilo di bande ottenuto.

Per la caratterizzazione mediante il protocollo MLVA è stato applicato un metodo basato sull'analisi di 5 loci genici: STTR9-STTR5-STTR6-STTR10pl-STTR3 secondo Lindstedt et al. (2004). I prodotti di amplificazione dei 5 loci sono stati sottoposti a separazione capillare mediante sequenziatore automatico Beckman Coulter (USA) della serie CEQ. I dati grezzi della separazione capillare sono stati analizzati mediante il programma "Default Fragment Analysis STTR" partendo dal modulo Fragments del Software CEQ 8000 (versione 8.0). Per ogni ceppo è risultato visibile nell'elettroferogramma la presenza di un picco colorato per ciascun locus genico indagato, con indicata la dimensione in nucleotidi (nt). Dalla dimensione dei frammenti è stato possibile ricavare il numero di "tandem repeats" (TRs) presenti in ciascun locus secondo quanto specificato da Larsson et al. (2009) e quindi dedurre il profilo MLVA come successione di 5 numeri corrispondenti al numero di TRs presenti nei loci STTR9-STTR5-STTR6-STTR10pl-STTR3 rispettivamente. Per ciascun ceppo il profilo MLVA ottenuto è stato importato come carattere discreto nel database del software BioNumerics.

Analisi statistica

I ceppi di *S. 4,[5],12:i-* sono stati suddivisi in classi di multiresistenza agli antibiotici. La differente distribuzione di queste classi di resistenza tra i ceppi isolati nei linfonodi campionati al macello ed i ceppi isolati da campioni della produzione primaria è stata testata tramite test χ^2 con $p < 0.01$.

Il potere discriminante tra i ceppi in esame delle due metodiche di genotipizzazione PFGE ed MLVA sia separatamente sia combinando i dati emersi da entrambe le metodiche, è stato valutato attraverso il calcolo dell'Indice di Diversità di Simpson (<http://darwin.phylovis.net/ComparingPartitions/>).

RISULTATI

Prevalenza e sierotipi di Salmonella spp. isolati da linfonodi al macello.

Salmonella spp. è stata isolata in 231 dei 1230 (18,78%, 95%CI: 16,60%-20,96%) linfonodi ileocecali campionati da partite di suini macellati (Tabella 1).

Tabella 1. Distribuzione dei sierotipi di *Salmonella enterica* isolati dai linfonodi ileocecali dei suini macellati.

Table 1. Distribution of *Salmonella enterica* serotypes detected of ileocecal lymph nodes in slaughter pigs.

Sierotipi di <i>Salmonella enterica</i> isolati	LNI positivi (n)	% prevalenza
4,[5],12:i:-	55	4,47
Rissen	40	3,25
Derby	33	2,68
Oranienburg	19	1,55
Goldcoast	18	1,46
London	17	1,38
Branderburg	12	0,98
Typhimurium	9	0,74
Livingstone	8	0,66
Montevideo	3	0,24
Choleraesuis	3	0,24
Bradney	3	0,24
0:1,3,19 (E4)	2	0,16
Kapemba	2	0,16
Umbilo	1	0,08
Thompson	1	0,08
Panama	1	0,08
Muenster	1	0,08
Mishmarhaemek	1	0,08
Kottbus	1	0,08
Infantis	1	0,08
Totale	231	18,78%

LNI, linfonodi ileocecali

Attraverso la sierotipizzazione dei ceppi isolati sono stati identificati 21 sierotipi di *Salmonella*, tra questi *S.* 4,[5],12:i:- è risultato il sierotipo maggiormente isolato (4,47%),

seguito dalla *S. Rissen* (3,25%) e *S. Derby* (2,68%) mentre *S. Typhimurium* ha presentato una prevalenza al macello soltanto dello 0,74%.

In termini di partite analizzate 38 partite su 41 (92,7%) campionate sono risultate positive per la presenza di almeno un sierotipo di *Salmonella*.

Antibiotico-resistenza e fenotipi di resistenza

Il test di sensibilità agli antibiotici è stato eseguito su 94 ceppi di *S. 4,[5],12:i:-* di cui 55 isolati da linfonodi prelevati al macello e 39 provenienti da campioni patologici. Il 90,42% degli isolati è risultato essere multiresistente (resistenza a 4 o più antibiotici). Il 48,94% dei ceppi è stato classificato come tetra-resistenti o ASSuT (resistenza nei confronti di Ampicillina-Streptomicina-Sulfametossazolo-Tetraciclina) ed il 41,49% è risultato essere penta-resistente o ACSSuT (resistenza nei confronti di Ampicillina-Cloramfenicolo-Streptomicina-Sulfametossazolo-Tetraciclina). Il tasso di resistenza ai singoli antibiotici testati è riportato in tabella 2.

Tabella 2. Antibiotico-resistenza dei ceppi di *Salmonella 4,[5],12:i:-* alle diverse classi di antibiotici.

Table 2. Antimicrobial resistance of stains of *Salmonella 4,[5],12:i:-* to different classes of antibiotics.

Antibiotico	Numero di isolati resistenti Tot=94	% degli isolati resistenti
Ampicillina	87	92,55%
Cloramfenicolo	40	42,55%
Streptomicina	94	100%
Sulfametossazolo	94	100%
Tetraciclina	85	90,43%
Gentamicina	55	58,51%
Florfenicolo	38	40,43%
Kanamicina	38	40,43%
Trimetoprim	28	29,79%
Acido nalidixico	35	37,23%
Colistina	19	20,21%
Cefotaxime	6	6,38%
Ceftazidime	11	11,70%
Ciprofloxacina	5	5,32%

I risultati delle minime concentrazioni inibenti ottenute dai 94 ceppi di *Salmonella Typhimurium* variante monofasica per i 14 antimicrobici testati sono riportati in tabella 3.

Tabella 3. Risultati di MIC per i 14 antimicrobici testati dei 94 ceppi di Salmonella Typhimurium variante monofasica.
Table 3. MICs for 14 antimicrobial agents of 94 Salmonella Typhimurium monophasic variant.

Antimicrobici	Distribuzione degli isolati (conta) nel range di diluizione del valore di MIC ($\mu\text{g/ml}$)																	
	0,008	0,015	0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024
Ampicillina								2	4	1				87 (>32)				
Cloramfenicolo							1 (<2)	11	38	4			2	38 (>64)				
Streptomicina													1	3	90 (>128)			
Sulfametossazolo																	94 (>1024)	
Tetraciclina							1 (<0,5)	4	3	1			1	1	83 (>64)			
Gentamicina								1	19	19		7	15	33 (>32)				
Florfenicolo							1 (<2)		38	17		5	1	32 (>64)				
Kanamicina									2 (<4)	6	25	23		13	6	19 (>128)		
Trimetoprim							44 (<0,5)	5	13	3		2	2	24 (>32)				
Acido nalidixico													26 (<4)	21	12	18	10	7 (>64)
Colistina										74 (<2)	1	9	10 (>4)					
Cefotaxime				10 (<0,06)	1	35	27	14	1					6 (>4)				
Ceftazidime					38 (<0,25)	3	38	3	1	4	2	5 (>16)						
Ciprofloxacina																		

I campi in grigio indicano il range di diluizione di ogni antibiotico. I breakpoints di resistenza per ogni antibiotico sono indicati dalla banda verticale nera.

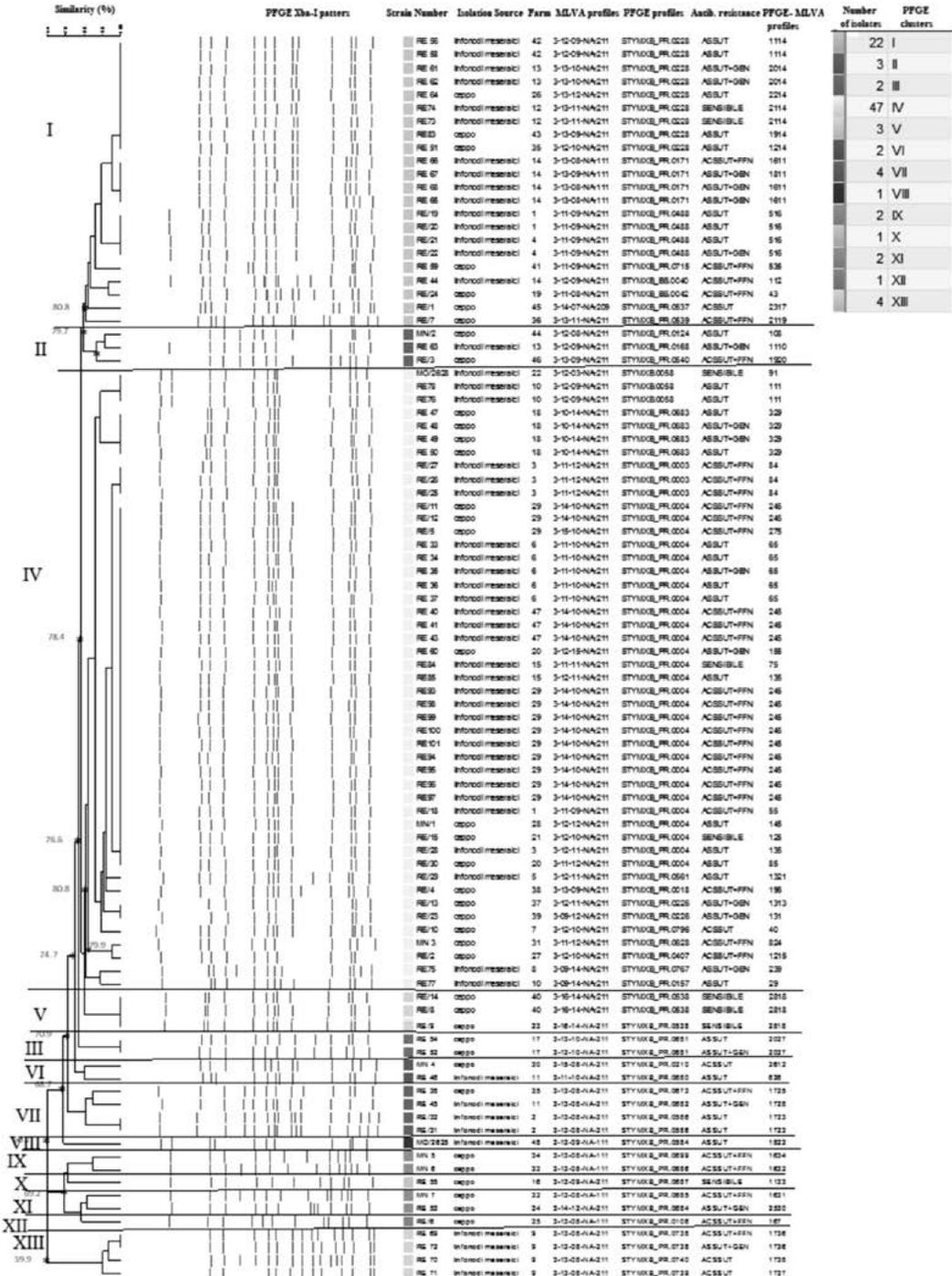
Resistenze aggiuntive alla gentamicina (19,15%) e al florfenicolo (36,17%) sono state osservate rispettivamente nei ceppi presentanti i fenotipi ASSuT e ACSSuT. La distribuzione delle classi di resistenza agli antimicrobici non differiva significativamente tra i ceppi di *S.* 4,[5],12:i:- isolati rispettivamente al macello e da campioni provenienti dalla produzione primaria, ad eccezione della ciprofloxacina (0% di ceppi resistenti isolati al macello, Vs 12,2% isolati dalla produzione primaria, $p<0.01$) e dell'acido nalidixico (22,6% di ceppi resistenti isolati al macello Vs 56,1% in produzione primaria, $p<0.01$).

Caratterizzazione molecolare mediante PFGE e MLVA di ceppi di S. 4,[5],12:i:-

Tra i 94 ceppi genotipizzati la PFGE ha individuato 40 differenti genotipi. STYMXB_PR.0004 è risultato il pulsotipo più frequentemente rilevato e in cui ricadono sia ceppi isolati al macello (21) sia ceppi isolati in campioni patologici (7). In 28 casi il pulsotipo rilevato è risultato presente soltanto in un ceppo, questo ha riguardato 19 ceppi di campo e 9 ceppi isolati al macello. La “*cluster analysis*” dei profili PFGE, effettuata utilizzando il coefficiente di similarità DICE metodo UPGMA, ha permesso di ottenere un dendrogramma (Figura 1) nel quale i ceppi sono stati raggruppati in 13 differenti clusters, indicati dall'I al XIII. I profili che mostravano una percentuale di similarità maggiore o uguale all'80% sono stati raggruppati nello stesso cluster. Nel cluster I e nel IV sono stati compresi rispettivamente 22 e 47 ceppi, pari al 73,4 % dei ceppi esaminati.

Figura 1. Dendrogramma di 94 *S. enterica* 4,[5],12:i:- basato sui profili PFGE. Sono evidenziati 13 cluster.

Figure 1. Dendrogram of 94 *S. enteric* 4,[5],12:i:- based on *Xba*-I PFGE profiles. Thirteen cluster (I-XIII) are marked.



Con la metodica MLVA sono stati individuati 28 differenti profili genetici, il genotipo più frequente (3-14-10-NA-211) è risultato presente in 2 ceppi isolati da materiale patologico ed in 12 ceppi isolati al macello. In 12 occasioni i ceppi tipizzati hanno mostrato un profilo genetico unico.

La maggior variabilità della metodica MLVA è stata riscontrata nei loci STTR5 e STTR6 con rispettivamente 8 e 9 alleli differenti e con un valore di Indice di Diversità di Simpson pari a 0,805 e 0,814 rispettivamente. Il locus STTR10pl, localizzato sul plasmide batterico *pSLT*, è risultato assente in tutti i ceppi analizzati, mentre al locus STTR9 è stato individuato un unico allele a 3 ripetizioni in tutti i ceppi.

Il calcolo dell'Indice di Diversità di Simpson tra le due metodiche è risultato pari a 0,898 e 0,926 per la PFGE e l'MLVA rispettivamente (Tabella 4), le due metodiche risultano significativamente differenti tra loro in termini di potere discriminante ($p < 0,05$). Combinando insieme i profili diversi ottenuti dalle due metodiche il potere discriminante aumenta in modo significativo (Indice di Diversità di Simpson 0,97 $p < 0,001$).

Tabella 4. Indice di diversità calcolati per la PFGE, l'MLVA e la combinazione PFGE-MLVA.
Table 4. Indices of diversity calculated for PFGE, MLVA and the combination PFGE-MLVA.

Tecnica	Numero di profili	Indice di diversità di Simpson	IC (95%)	p-value *
PFGE	40	0,898	(0,846-0,951)	0,040
MLVA	28	0,946	(0,928-0,964)	
PFGE-MLVA	57	0,970	(0,950-0,990)	<0,001

* p-value calcolato secondo il metodo "Jackknife pseudo-values resampling"

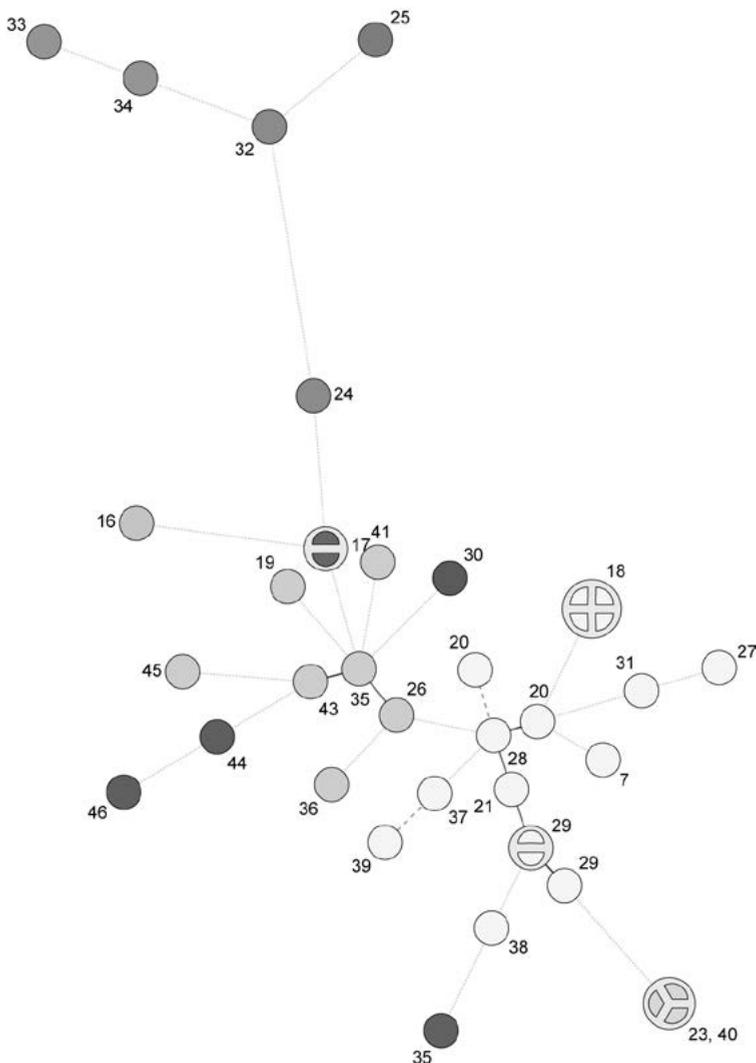
Utilizzando i dati di entrambi i metodi di tipizzazione le 94 salmonelle isolate mostrano 57 differenti genotipi (Figura 1). In un caso lo stesso ceppo (profilo PFGE_MLVA 245) è stato rilevato sia al macello che in materiale patologico, in tutti gli altri casi il ceppo è stato rilevato o soltanto al macello o soltanto in produzione primaria. Osservando soltanto i 39 ceppi isolati da materiale patologico, dai 30 allevamenti di provenienza, sono stati identificati 32 differenti genotipi di *Salmonella* monofasica. Quando più di una *Salmonella* monofasica è stata isolata dal medesimo allevamento, in 3 casi si è trattato del medesimo genotipo ed in altrettanti 3 casi gli isolati sono risultati differenti tra loro (Figura 2). In 24 casi si è isolato un solo genotipo di *Salmonella*.

Figura 2. MST generato dal Software BioNumerics basato sui profili combinati PFGE-MLVA di 39 ceppi *S. enterica* 4,[5],12:i:- isolati da suini.

E' stata creata una cluster analysis a partire da un "dataset composit" di PFGE-MLVA (Average from Experiment-UPGMA). Ogni nodo rappresenta un unico profilo combinato PFGE-MLVA, i nodi possono essere suddivisi in sezioni, il numero di sezioni è uguale al numero di ceppi con quel profilo. I colori dei nodi si riferiscono a differenti gruppi PFGE (vedi dendrogramma Figura 1). I numeri indicati in prossimità dei nodi corrispondono ai diversi allevamenti di provenienza dei suini.

Figure 2. MST generated by BioNumerics Software based on PFGE-MLVA combined allelic profiles of 39 *S. enterica* 4,[5],12:i:- isolated from pigs.

A cluster analysis based on Composit Dataset of PFGE-MLVA profiles was generated. Each node represents a unique PFGE-MLVA profile and can be divided in more than one section, the number of sections is equal to the number of strains with the same profile. The colors of the nodes indicate different PFGE clusters (see Figure 1).The numbers listed near the nodes correspond to the different farms of origin of pigs.



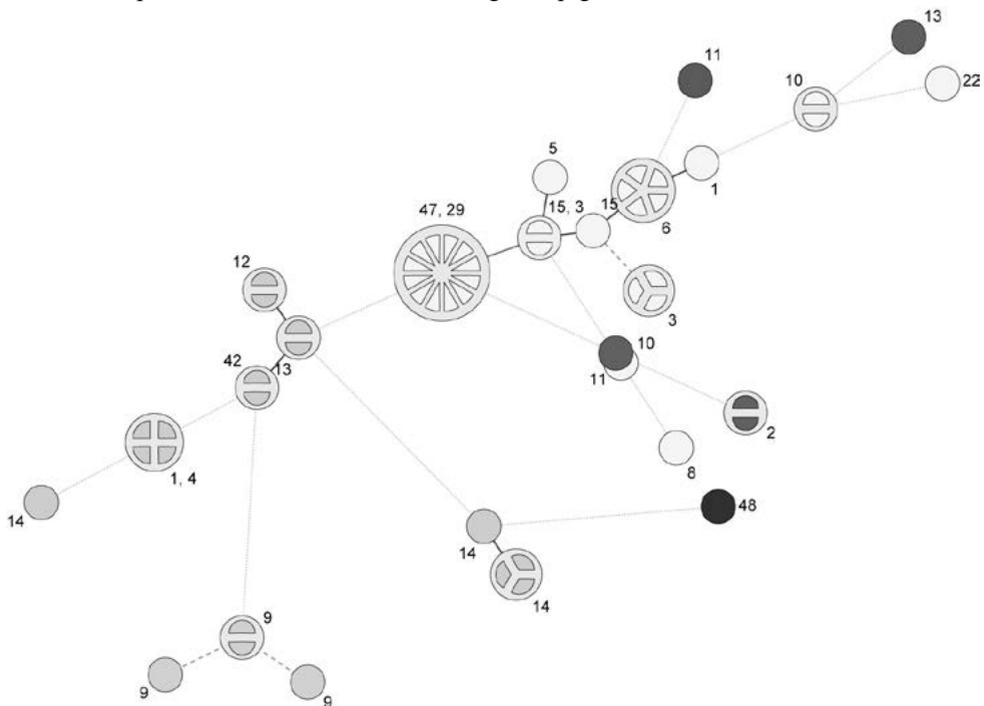
Analizzando i ceppi isolati dai linfonodi al macello questi provenivano da 19 allevamenti differenti. I ceppi mostravano complessivamente 26 diversi profili PFGE_MLVA (corrispondenti ai 26 nodi dell'MST di Figura 3). In linfonodi provenienti da 8 allevamenti, nella medesima partita di macellazione, più di un genotipo di variante monofasica è stata rilevata al macello (all.to: 1, 3, 9, 10, 11, 13, 14, 15), nei restanti 11 allevamenti soltanto un genotipo è stato ritrovato nella partita di macellazione (all.to: 2, 4, 5, 6, 8, 12, 22, 29, 42, 47, 48).

Figura 3. MST generato dal Software BioNumerics basato sui profili combinati PFGE-MLVA di 55 ceppi *S. enterica* 4,[5],12:i:- isolati dai suini al MACELLO.

E' stata creata una cluster analysis a partire da un "dataset composit" di PFGE-MLVA (Average from Experiment-UPGMA). Ogni nodo rappresenta un unico profilo PFGE-MLVA, i nodi possono essere suddivisi in sezioni, il numero di sezioni è uguale al numero di ceppi con quel profilo. I colori dei nodi si riferiscono a differenti gruppi PFGE (vedi dendrogramma Figura 1). I numeri indicati in prossimità dei nodi corrispondono ai diversi allevamenti di provenienza dei suini.

Figure 3. MST generated by BioNumerics Software based on PFGE-MLVA combined allelic profiles of 55 *S. enteric* 4,[5],12:i:- isolated from pigs at SLAUGHTERHOUSE.

A cluster analysis based on Composit Dataset of PFGE-MLVA profiles was generated. Each node represents a unique PFGE-MLVA profile and can be divided in more than one section, the number of sections is equal to the number of strains with the same profile. The colors of the nodes indicate different PFGE clusters (see Figure n. 1).The numbers listed near the nodes correspond to the different farms of origin of pigs.



Dal punto di vista delle resistenze agli antibiotici, nessun particolare genotipo risulta associato ai differenti profili fenotipici (ASSuT e ACSSuT).

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

I risultati ottenuti nel presente studio relativi alla prevalenza di *Salmonella* in linfonodi di suini regolarmente macellati (18,78%) appaiono in accordo con quanto riportato nei risultati di uno studio condotto dall'EFSA sulla prevalenza al macello in Italia (16,5%) (EFSA, 2008). Il dato ottenuto appare in linea con quanto osservato in altri Paesi come Francia (18,1%), Spagna (29%), Irlanda (16,1%) e nettamente superiore a quella riscontrata in stati con bassi livelli di prevalenza come Svezia (1,3%), Danimarca (7,7%) e Olanda (8,5%) (EFSA, 2008). I fattori di rischio che sono alla base di questa elevata prevalenza per l'allevamento italiano possono essere inquadrati nell'impiego di abbondanti quantità di alimento liquido e nella durata del periodo di ingrasso, maggiore in Italia rispetto a quello osservato negli altri Stati europei, con una durata di 3-4 mesi in più rispetto a quello richiesto per la produzione del suino leggero (Meriardi et al., 2008).

La prevalenza riscontrata per i singoli sierotipi indicano un significativo aumento della variante monofasica *S.* 4,[5],12:i:- mentre *S.* Typhimurium ha evidenziato nel nostro studio una prevalenza dello 0,74%, in diminuzione rispetto al dato riportato dall'EFSA nel 2008 dell'1,6%. L'elevata prevalenza della variante monofasica appare un dato di estremo interesse, confermando l'emergenza legata alla diffusione di questo sierotipo, raramente isolato fino alla metà degli anni '90 e diventato oggi tra i principali sierotipi, in termini di frequenza, isolati da casi di salmonellosi umana. Da notare da questo punto di vista, che uno dei ceppi di variante monofasica tipizzati in questo studio è risultato essere identico ad un ceppo isolato in un caso di salmonellosi umana avvenuto nel medesimo anno di campionamento (dati non mostrati).

La valutazione dei profili di antibiotico-resistenza ha messo in evidenza come il 48,9% dei ceppi di variante monofasica *S.* 4,[5],12:i:- testati nello studio presentasse un profilo di tetra-resistenza nei confronti di ampicillina, streptomina, sulfamidici e tetraciclina o ASSuT. Questo dato è in accordo con quanto evidenziato negli anni precedenti in Italia dove un nuovo fenotipo di resistenza ASSuT, è emerso tra i ceppi di *Salmonella* Typhimurium e della sua variante monofasica isolati in casi di salmonellosi nell'uomo (Dionisi et al., 2009). Il 41,5% dei ceppi *S.* 4,[5],12:i:- ha presentato un profilo di penta-resistenza o ACSSuT mostrando, rispetto ai ceppi presentati il profilo ASSuT, resistenza anche nei confronti del cloramfenicolo.

Tra i due gruppi di isolati (macello e allevamento) non sono state registrate differenze significative in termini di resistenza, eccetto per la ciprofloxacina e l'acido nalidixico, dove i ceppi di variante monofasica isolati dai suini al macello hanno evidenziato livelli di resistenza inferiori o assenti nei confronti di queste molecole se comparati con i ceppi isolati da campioni patologici. Tali differenze sono risultate statisticamente significative.

Le resistenze registrate nei confronti di ciprofloxacina (5,32%), cefotaxime (6,38%) e ceftazidime (11,70%), forniscono un dato che necessita un'attenta valutazione considerando che in altri Paesi, come ad esempio la Danimarca, nei ceppi di variante monofasica non si registrano resistenze nei confronti di fluorochinoloni e cefalosporine (Arguello et al., 2013), sottolineando la necessità di preservare l'efficacia di queste molecole per l'importanza che rivestono in medicina umana. La percentuale di resistenza osservata per il florfenicolo (40,43%) rappresenta sicuramente motivo di preoccupazione, considerando che questa molecola è relativamente di nuova introduzione, essendo registrata dal 2000 per la terapia antibiotica nel suino.

Al fine di studiare le relazioni genetiche esistenti tra i 94 ceppi di *S.* 4,[5],12:i:-, isolati da suini al macello e dall'attività diagnostica dell'IZSLER nell'anno 2013, sono state

applicate le metodiche di genotipizzazione PFGE ed MLVA ed è stato valutato il loro potere discriminante.

Nel presente studio i valori degli indice di Diversità di Simpson calcolati per la metodica MLVA e per la PFGE sono risultati alti ed è stata osservata una differenza statisticamente significativa tra le due metodiche, risultando la metodica MLVA più discriminate della PFGE. Utilizzando i profili combinati delle due metodiche si ottiene un indice di diversità significativamente maggiore rispetto all'utilizzo delle metodiche singolarmente. Questo rimarca l'importanza di utilizzare più di un metodo di tipizzazione genetica per ricercare relazioni epidemiologiche tra i ceppi di *Salmonella* isolati, come evidenziato anche in una recente pubblicazione (Barco et al., 2014) che analizza due focolai di salmonellosi umana che hanno coinvolto la variante monofasica.

Relativamente ai 57 genotipi combinati PFGE-MLVA rilevati, 31 provenivano da campioni patologici e 25 da linfonodi isolati al macello, uno era comune a entrambe le categorie di origine. I campioni patologici provenivano da 30 differenti allevamenti, mentre i ceppi isolati da linfonodi al macello provenivano da 19 allevamenti. Quando è stata isolata più di una variante monofasica dal medesimo allevamento sia in sede di macellazione sia da campioni patologici, per circa la metà dei casi esse sono risultate appartenere al medesimo genotipo (7 casi su 15 al macello e 3 casi su 6 tra i ceppi isolati nella produzione primaria), nella restante parte dei casi più di un genotipo è stato rilevato. L'isolamento di ceppi di *S.* 4,[5],12:i:- presentanti profili diversi da uno stesso allevamento può essere legata a due principali fattori. Il primo di questi è costituito dall'elevato numero di sorgenti d'infezione che si possono osservare a livello di produzione primaria (introduzione di animali da altri allevamenti o siti, l'alimento, l'acqua di bevanda, la circolazione di uccelli selvatici, di roditori o di altri animali) che possono veicolare diversi ceppi appartenenti allo stesso sierotipo o a sierotipi diversi. Il secondo fattore, già citato in precedenza, è legato alla tipologia produttiva, tipicamente italiana, del suino pesante che si caratterizza con la macellazione di animali di almeno 9 mesi d'età e che pertanto sono esposti al rischio d'infezione per periodi più lunghi rispetto ad altre tipologie produttive europee. A questo proposito si ribadisce come l'infezione da *Salmonella* spp. si osserva nelle prime fasi del periodo d'ingrasso (150 gg di vita), con un progressivo aumento della sieroprevalenza che raggiunge il livello massimo all'età di macellazione (Merialdi et al., 2008).

Come naturale conseguenza questi fattori influenzano anche la possibilità di isolare ceppi di *S.* 4,[5],12:i:- con profili diversi al macello, sebbene in questa sede, altre cause possono determinare addirittura un aumento di questo fenomeno. Lo stress degli animali legato al trasporto verso l'impianto di macellazione, così come il digiuno forzato prima della macellazione, aumentano l'eliminazione di *Salmonella* da parte di animali portatori che possono così contaminare le strutture adibite al trasporto e i box delle stalle di sosta del macello (Carlson et al., 2012). A questo proposito è stato osservato come la prevalenza dell'infezione aumenti in proporzione all'attesa nei box delle stalle di sosta al macello prima della macellazione, considerando che è possibile l'isolamento del microrganismo dai linfonodi sottomandibolari due ore dopo l'infezione (Hurd et al., 2001).

Questo rimarca l'importanza di monitorare la presenza di *Salmonella* in differenti momenti dell'allevamento suino, dai riproduttori fino al finissaggio degli animali ed al macello, dove è possibile rilevare nella medesima partita salmonelle differenti da quelle osservate in allevamento (Magistrali et al., 2008).

In conclusione, i risultati del nostro studio confermano l'alta prevalenza di *Salmonella* spp. in suini regolarmente macellati e sottolineano l'elevata incidenza della variante monofasica *S.* 4,[5],12:i:- che si conferma come sierotipo emergente ed attualmente preponderante. I dati di

antibiotico-resistenza ottenuti dai ceppi di S. 4,[5],12:i:- da un lato confermano la circolazione di due principali profili fenotipici di multiresistenza (ASSuT ed ACSSuT) e dall'altro evidenziano fenomeni di resistenza antibiotica sia nei confronti di molecole d'interesse per la salute animale (florfenicolo e colistina) sia per la salute pubblica come fluorochinoloni e cefalosporine. L'impiego combinato di metodiche di genotipizzazione come PFGE e MLVA ha evidenziato un elevato potere discriminante confermando l'importanza del loro utilizzo in studi epidemiologici. I risultati ottenuti, quindi, sottolineano l'importanza di un continuo monitoraggio della prevalenza, della resistenza agli antibiotici e della variabilità genetica dei ceppi circolanti per una migliore comprensione dell'epidemiologia dell'infezione da *Salmonella* che possedendo tutti gli attributi per un'ampia diffusione (numerose serbatoi, efficiente eliminazione fecale, persistenza nell'ambiente ed efficace trasmissione attraverso vettori meccanici) risulta estremamente complessa e di conseguenza di difficile controllo.

RINGRAZIAMENTI

Questo studio è stato finanziato dal Ministero della Salute, Dipartimento per la Sanità Pubblica Veterinaria, la Nutrizione e la Sicurezza Alimentare (PRC2011013). Si ringrazia la Sig.ra Anna Frulio per l'assistenza tecnica fornita nell'esecuzione della PFGE e il Dott. Luca Bolzoni per il supporto statistico nell'elaborazione dati derivati dall'analisi genetica.

BIBLIOGRAFIA

Alcaline S.D., Warnick L.D., Wiedmann M. (2007) "Antimicrobial resistance in non typhoidal Salmonella". J. Food. Prot. 70, 780-790.

Antunes P., Mourao J., Pestana N., Peixe L. (2011) "Leakage of emerging clinically relevant multidrug-resistant Salmonella clones from pig farms". J. Antimicrob. Chemother. 66, 2028-2032.

Arguello H., Sorensen G., Carvajal A., Baggesen D.L., Rubio P., Pedersen K. (2013) "Prevalence, serotypes and resistance patterns of Salmonella in Danish pig production". Res. Vet. Sci. 95, 334-342.

Barco L., Ramon E., Cortini E., Longo A., Dalla Pozza M.C., Lettini A.A., Dionisi A.M., Olsen J.E., Ricci A. (2014) "Molecular characterization of Salmonella enterica Serovar 4,[5],12:i:- DT193 ASSuT Strains from two outbreaks in Italy". Foodborne Pathog. Dis. 11,138-144.

Carlson S., Barnhill A.E., Griffith R.W. (2012) "Salmonellosis" in Zimmerman J.J., Karriker L.A., Ramirez A., Schwartz K.J., Stevenson G.W. "Diseases of swine" 10a ed., West Sussex, UK, Wiley-Blackwell, 821-833.

Clinical and Laboratory Standards Institute (2008) "Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution susceptibility Tests for bacteria Isolated from Animals, approved standard, 3rd edn". CLSI, Wayne, Pennsylvania.

CSFM (2013) "Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. Communiqué". Available at http://www.sfm-microbiologie.org/UserFiles/file/CASFM_2013.pdf.

Dionisi A.M., Graziani C., Lucarelli C., Filetici E., Villa L., Owczarek S., Caprioli A., Luzzi I. (2009) "Molecular characterization of multidrug-resistant of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium and monophasic variant (S. 4,[5],12:i:-) isolated from human infections in Italy". *Foodborne Pathog. Dis.* 6, 711-717.

Edwards P.R. (1962) "Serologic examination of *Salmonella* cultures for epidemiologic purposes". *Public Health Service Publication. National Communicable Disease Center, Atlanta.*

European Food Safety Authority, (2008) "Report of the taskforce on zoonoses data collection on the analysis of the baseline survey on the prevalence of *Salmonella* in slaughter pigs, in EU, 2006-2007". *EFSA J.* 135, 1-111.

European Food Safety Authority, (2010) "Panel on biological hazards (BIOHAZ) scientific opinion on a quantitative microbiological risk assessment of *Salmonella* in slaughter and breeder pigs". *EFSA J.* 8 (4), 1547.

European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control (2012) "The European Union summary report on trends and sources of zoonoses zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2010". *EFSA J.* 10, 2597.

European Food Safety Authority, (2013) "The European Union Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2011". *EFSA J.* 11 (5), 3196.

Grimont P.A.D., Weill F.X. (2007) "Antigenic formulae for the *Salmonella* serovars (9th ed.)". *WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella. Institut Pasteur, Paris, France.* (<http://www.pasteur.fr/ip/portal/action/WebdriveActionEvent/oid/01s-000036-089>).

Graziani C., Busani L., Dionisi A.M., Lucarelli C., Owczarek S., Ricci A., Mancin M., Caprioli A., Luzzi I. (2008) "Antimicrobial resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium from human and animal sources in Italy". *Vet. Microbiol.* 128, 414-418.

Hauser E., Tietze E., Helmuth R., Junker E., Blank K., Prager R., Rabsch W., Appel B., Fruth A., Malorny B. (2010) "Pork contaminated with *Salmonella enterica* serovar 4,[5],12:i:-, an emerging health risk for humans". *App. Environ. Microb.* 76, 4601-4610.

Hopkins K.L., Kirchner M., Guerra B., Granier S.A., Lucarelli C., Porrero M.C., Jakubczak A., Threlfall E.J., Mevius D.J. (2010) "Multiresistant *Salmonella enterica* serovar 4, [5],12:i- in Europe: a new pandemic strain? *Euro Surveill.* 15, 19580.

Hur J., Choi Y.Y., Park J.H., Jeon B.W., Lee H.S., Kim A.R., Lee J.H. (2011) "Antimicrobial resistance, virulence-associated genes and pulsed field gel electrophoresis profiles of *Salmonella enterica* subsp *enterica* serovar Typhimurium isolated from piglets with diarrhea in Korea". *Can. J. Vet. Res.* 75, 49-56.

Hurd H.S., Gailey J.K., McKean J.D., Rostagno M.H. (2001) "Rapid infection in market-weight swine following exposure to a *Salmonella* Typhimurium-contaminated environment". *Am. J. Vet. Res.* 62, 1194-1187.

International Organization for Standardization. (2007) "ISO 6579:2002/ Amd 1:2007. Detection of *Salmonella* spp. in animal faeces and in environmental samples from the primary production stage, amendment 1, annex D". In *Microbiology of food and animal feedings stuffs. Horizontal method for the detection of Salmonella spp.* International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.

Larsson J.T., Torpdahl M., Peterson R.F., Sorensen G., Lindstedt B.A., Nielsen E.M. (2009) "Development of a new nomenclature for *Salmonella typhimurium* multilocus variable number of tandem repeats analysis (MLVA)". *Euro Surveill.* 14(15) pii, 19174.

Lindstedt B.A., Vardund T., Aas L., Kapperud G. (2004) "Multiple-Locus Variable-Number Tandem-Repeats Analysis of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Typhimurium* using PCR multiplex and multicolor capillary electrophoresis". *J. Microbiol. Methods* 59, 163-172.

Magistrali C., Dionisi A.M., De Curtis P., Cucco L., Vischi O., Scuota S., Zicavo A., Pezzotti G. (2008) Contamination of *Salmonella* spp. In a pig finishing herd, from the arrival of the animals to the slaughterhouse". *Res. Vet. Sci.* 85, 204-207.

Mainar-Jaime R.C., Andrés S., Vico J.P., Garrido V., Grilló M.J. (2012) "Sensitivity of the ISO 6579:2002/Amd 1:2007 Standard Method for detection of *Salmonella* spp. on Mesenteric Lymph Nodes from Slaughter pigs". *J. Clin. Microbiol.* 51, 89-94.

Meakins S., Fisher I.S., Berghold C., Gerner-Smidt P., Tschäpe H., Cormican M., Luzzi I., Schneider F., Wannett W., Coia J., Echeita A., Threlfall E.J. (2008) "Antimicrobial drug resistance in human nontyphoidal *Salmonella* isolates in Europe 2000-2004: a report from the Enter-net International Surveillance Network". *Microb. Drug Resist.* 14, 31-35.

Merialdi G., Barigazzi G., Bonilauri P., Tittarelli C., Bonci M., D'Incau M., Dottori M. (2008) "Longitudinal study of *Salmonella* infection in Italian farrow-to-finish swine herds". *Zoonoses Public Health* 55, 222-226.

Morris G.K., Steele C.D., Wells J.G. (1972) "Evaluation of plastic multi-well plates for serological screening of *Salmonella* cultures with Spicer-Edwards pooled antisera". *Appl. Microbiol.* 24, 846-848.

Pires S.M., de Knecht L., Hald T. (2011) "Estimation of the relative contribution of different food and animal sources to human *Salmonella* infections in the European Union. Scientific/technical report". European Food Safety Authority, Parma, Italy.

Regolamento (CE) n. 2160/2003 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 17 novembre 2003, sul controllo della *Salmonella* e di altri agenti zoonotici specifici presenti negli alimenti. *Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea*, L. 325/1 del 12.12.2003.

Spicer C.C. (1956) "A quick method of identifying *Salmonella* H antigens". *J. Clin. Pathol.* 9, 378-379.