

COMUNICAZIONE 4

INDIVIDUAZIONE DI MARKER GENETICI DELLA RESISTENZA A PENICILLINE ED AMINOGLICOSIDI IN CEPPI DI *SALMONELLA ENTERICA* SUBSP. *ENTERICA* SIEROTIPO TYPHIMURIUM

F. Pasquali, G. Manfreda

Dipartimento di Scienze degli Alimenti, Università di Bologna

Parole chiave: penicilline, spectinomycin-streptomycin, fagotipo, origine, *Salmonella* Typhimurium

Detection of penicillin and aminoglycoside resistance genes in *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotype Typhimurium isolates of different phage types and origins

Key words: penicillins, spectinomycin-streptomycin, phage type, source, *Salmonella* Typhimurium

Summary: In the present study 32 multiresistant *Salm.* Typhimurium strains of different phage types and collected from human and poultry, were investigated in order to evaluate the presence and localisation within integrons, of beta lactam resistance genes, *psel* and *tem 1-2*, and spectinomycin-streptomycin resistance gene, *ant(3'')-Ia*. 16 and 27 strains of different phage types, exhibited respectively *psel* and *ant(3'')-Ia* genes. Among those strains 14 and 26 respectively exhibited these genes within integrons of 1008, 1133, 1450 and 2100 bp approximately. The first two integrons were observed not only in DT104 phage type, as previously described, but also in other phage types (DT12, NT, U302). In particular RDNC strains, all of human origin, exhibited two different integrons of approximately 1450 and 2100 bp containing only *ant(3'')-Ia* gene.

Correspondence: Gerardo Manfreda, Dipartimento di Scienze degli Alimenti, Alma Mater Studiorum - Università di Bologna, Via S. Giacomo 9, 40126 Bologna, Italy. Email: manfreda@alma.unibo.it

Introduzione

La comparsa di ceppi di *Salmonella* (*Salm.*) Typhimurium multiresistenti è un problema sanitario mondiale (6). L'acquisizione di tale carattere è spesso dovuto alla presenza di determinanti dell'antibiotico resistenza in elementi genetici mobili (es. gene cassettes). Queste strutture, mediante plasmidi e trasposoni, possono passare da un batterio ad un altro ed integrarsi a livello cromosomico in strutture genetiche dette integroni che, grazie alla presenza di un promotore, garantiscono un'espressione costante di tali geni (3). In particolare in *Salm.* Typhimurium DT104, sono stati individuati, in integroni di classe I, i geni *psel*, e *ant(3'')-Ia*, che codificano per una beta lattamasi e una adenililtransferasi, in grado di inattivare rispettivamente beta lattami (es. ampicillina) e spectinomycin-streptomycin (2,5).

Scopo del presente studio è stato quello di verificare la presenza dei suddetti geni e la loro localizzazione all'interno di integroni, in ceppi di *Salm.* Typhimurium multiresistenti, isolati in Italia da diverse fonti ed appartenenti a diversi fagotipi.

Materiali e metodi

Isolati testati

Gli isolati analizzati includono 32 ceppi di *Salm.* Typhimurium, di cui 9 di origine avicola e 23 di origine umana, appartenenti a 8 diversi fagotipi e risultati resistenti, secondo la metodica di Kirby-Bauer, ad ampicillina e spectinomycin. Una colonia pura per ciascun isolato, ottenuta da piastre LB agar, è stata trasferita in 5 ml di brodo LB e incubata overnight a 37°C prima dell'estrazione del DNA genomico.

Protocolli PCR

L'individuazione dei geni *psel*, *ant(3'')-Ia* e *intI* è avvenuta utilizzando la metodica riportata da Sanvang et al.(5). I ceppi risultati negativi per *psel* sono stati testati per la presenza dei geni *tem1-2*, codificanti per beta lattamasi, secondo il protocollo di Llanes et al.(4). Al fine di valutare l'eventuale localizzazione dei geni *tem1-2*, *psel* e *ant(3'')-Ia* all'interno di integroni, i ceppi positivi per i rispettivi geni sono stati testati usando combinazioni di primers forward dell'integrone e reverse di ogni gene di antibiotico resistenza secondo il protocollo di Sanvang et al.(5).

Il protocollo PCR per la combinazione *int-tem* è stato ottimizzato utilizzando 0.5 µM del primer forward di *intI*, 0.3 µM del primer reverse di *tem1-2* e 30 cicli ognuno dei quali caratterizzato da 1 min a 92°C, 2 min a 54°C e 3 min a 72°C.

Risultati

In Tabella 1 sono riportati i risultati relativi ai geni *tem1-2*, *psel* e *ant(3'')-Ia* e la loro localizzazione in integroni. 16 isolati hanno presentato il gene *psel*, e di questi, 14 sono risultati positivi per l'associazione *int-psel*. 4 ceppi di origine umana, appartenenti ai fagotipi DT104, DT179, DT194 e DT208, sono risultati positivi ai geni *tem1-2* senza che questi fossero localizzati all'interno di un integrone. I rimanenti 12 ceppi, pur essendo fenotipicamente resistenti, non hanno presentato positività per i marker genetici da noi selezionati e sono risultati appartenere tutti al fagotipo RDNC, ad eccezione del ceppo 248 con fagotipo DT208, ed isolati da fonte umana.

Inoltre 27 ceppi sono risultati positivi per il gene *ant(3'')-Ia* il quale, ad eccezione del ceppo 69 di origine avicola, è risultato localizzato all'interno di un integrone. 5 ceppi, tutti isolati da fonte umana ed appartenenti a fagotipi diversi, pur essendo fenotipicamente resistenti, sono risultati negativi per il gene *ant(3'')-Ia*.

I risultati relativi all'individuazione degli integroni hanno mostrato la presenza di 4 diversi tipi di integroni rispettivamente di circa 1008, 1133, 1450, 2100 bp. In particolare i primi due integroni erano presenti su ceppi isolati sia da fonte umana che da fonte avicola ed appartenenti ai fagotipi DT104, DT12, NT e U302 mentre gli altri due integroni sono stati individuati esclusivamente in ceppi di origine umana tutti appartenenti al fagotipo RDNC. Gli isolati di origine umana, appartenenti ai fagotipi DT179, DT194, DT208, non hanno presentato alcun integrone.

Discussione

La presenza di due integroni di 1008 bp e 1133 bp contenenti i geni *psel* e *ant(3'')-Ia*, già evidenziata da Sanvang et al.(5) in ceppi di *Salm.* Typhimurium DT104 di origine suina, è stata confermata dai risultati della nostra ricerca su ceppi DT104 di origine umana

ed avicola oltre che su ceppi appartenenti a fagotipi differenti quali DT12, NT, U302 e RDNC. Di particolare interesse risulta inoltre l'individuazione, nei ceppi RDNC esclusivamente di origine umana, di due integroni rispettivamente di ~1450 e ~2100 bp contenenti al loro interno il gene *ant(3'')-Ia*. Questo aspetto potrebbe essere utilizzato con finalità epidemiologiche, se ulteriori indagini confermano il risultato da noi ottenuto. Ulteriori approfondimenti sono richiesti per individuare su quali dei due integroni sono localizzati i geni di resistenza antibiotica e per verificare, mediante l'analisi delle strutture cromosomiche fiancheggianti i due integroni, la presenza, nei fagotipi DT12, NT, U302, e RDNC dell'isola di antibiotico resistenza già individuata in *Salm. Typhimurium* DT104, DT120 e in *Salm. Agona* (1).

Bibliografia

1. Boyd D., Peters G.A., Cloeckert A., Boumedine K.S., Chalus-Dancla E., Imberechts H., Moulvey M.R. (2001). Complete Nucleotide sequence of a 43- kilobase

genomic island associated with the multidrug region of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 and its identification in phage type DT120 and serovar Agona. J. Bacteriol. 183(19): 5725-5732.

2. Briggs C., Fratamico P. F. 1999. Molecular characterization of the antibiotic resistance gene cluster of *Salmonella typhimurium* DT104. Antimicrob. Agents. Chemother. 43:846-849.
3. Carattoli A. 2001. Importance of integrons in the diffusion of resistance. Vet. Res. 32: 243-259.
4. Llanes C., V. Kirchgerner, P. Plesiat. 1999. Propagation of TEM- and PSE- type β -lactamases among amoxicillin-resistant *Salmonella* spp. isolated in France. Antimicrob. Agents. Chemother. 43(10):2430-2436.
5. Sandvang D., F. M. Aarestrup, L. B. Jensen. 1998. Characterisation of integrons and antibiotic resistance genes in Danish multiresistant *Salmonella enterica* Typhimurium DT104. FEMS Microbiol. Lett. 160: 37-41.
6. Threlfall E.J. 2000. Epidemic *Salmonella typhimurium* DT104 - a truly international multiresistant clone. J. Antimicrob.Chemother.46:7-10.

Tabella 1. Caratterizzazione genetica dell'antibiotico resistenza in ceppi di *Salm. Typhimurium* di origine umana ed avicola

Table 1. Genetic characterisation of antibiotic resistance of *Salm. Typhimurium* strains of human and poultry origin

Ceppo	Fagotipo	Origine	<i>tem</i> 1/2 489 bp	<i>psel</i> 419 bp	<i>ant3''-Ia</i> 526 bp	integr. 1008 bp	integr. 1133 bp	integr. 1450 bp	integr. 2100 bp	<i>int+psel</i> ~800 bp	<i>int+ant</i> ~750 bp
191	DT 104	Uomo	-	+	+	+	+	-	-	+	+
192	DT 104	Uomo	-	+	+	+	+	-	-	+	+
193	DT 104	Uomo	-	+	+	+	+	-	-	+	+
239	DT 104	Uomo	-	+	+	+	+	-	-	+	+
240	DT 104	Uomo	+	-	-	-	-	-	-	-	-
241	DT 104	Uomo	-	+	+	+	+	-	-	+	+
242	DT 104	Uomo	-	+	+	+	+	-	-	+	+
24	DT 104	Avicoli	-	+	+	+	+	-	-	-	+
69	DT 104	Avicoli	-	+	+	+	+	-	-	-	-
165	DT 104	Avicoli	-	+	+	+	+	-	-	+	+
170	DT 104	Avicoli	-	+	+	+	+	-	-	+	+
58	DT 12	Avicoli	-	+	+	+	+	-	-	+	+
60	DT 12	Avicoli	-	+	+	+	-	-	-	+	+
63	DT 12	Avicoli	-	+	+	+	+	-	-	+	+
247	DT 179	Uomo	+	-	-	-	-	-	-	-	-
246	DT 194	Uomo	+	-	-	-	-	-	-	-	-
243	DT 208	Uomo	+	-	-	-	-	-	-	-	-
248	DT 208	Uomo	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21	NT	Avicoli	-	+	+	+	+	-	-	+	+
66	NT	Avicoli	-	+	+	+	+	-	-	+	+
204	RDNC	Uomo	-	-	+	-	-	+	+	-	+
205	RDNC	Uomo	-	-	+	-	-	+	-	-	+
206	RDNC	Uomo	-	-	+	-	-	+	-	-	+
207	RDNC	Uomo	-	-	+	-	-	+	-	-	+
208	RDNC	Uomo	-	-	+	-	-	+	-	-	+
210	RDNC	Uomo	-	-	+	-	-	+	-	-	+
211	RDNC	Uomo	-	-	+	-	-	+	-	-	+
212	RDNC	Uomo	-	-	+	-	-	+	-	-	+
213	RDNC	Uomo	-	-	+	-	-	-	+	-	+
215	RDNC	Uomo	-	-	+	-	-	+	-	-	+
216	RDNC	Uomo	-	-	+	-	-	+	-	-	+
245	U 302	Uomo	-	+	+	+	+	-	-	+	+
TOTALE		32	4	16	27	16	15	10	2	14	26