

# UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO

SCUOLA DI DOTTORATO IN SCIENZE BIOMEDICHE, CLINICHE E SPERIMENTALI  
DIPARTIMENTO DI SCIENZE CLINICHE E DI COMUNITÀ

CORSO DI DOTTORATO IN "EPIDEMIOLOGIA, AMBIENTE E SANITÀ PUBBLICA"

XXX CICLO

SETTORE SCIENTIFICO DISCIPLINARE MED/42



## EPIDEMIOLOGIA DESCRITTIVA E SORVEGLIANZA MOLECOLARE DI *SALMONELLA ENTERICA* SUBSP. *ENTERICA* SIEROTIPO NAPOLI IN LOMBARDIA

Tutor: Prof.ssa Antonella AMENDOLA, Prof.ssa Mirella PONTELLO  
Coordinatore: Prof. Carlo LA VECCHIA

Dottoranda:  
Maria GORI  
Matricola: R10949

Anno Accademico 2016/2017

## ABSTRACT

**Background:** Salmonellosis is a major food-borne disease worldwide with an estimated 93.8 million cases occurring each year, resulting in 155,000 deaths. In Europe, infections caused by *Salmonella enterica* serovar Napoli (*S. Napoli*) have notably increased over the last few years, mainly affecting France, Switzerland and Italy. Information about its epidemiology, ecology and virulence is poor, and no foodborne or environmental factor has been identified so far. While foodborne transmission is the most common route for *Salmonella* infections, this does not appear to be the case for the increase of this serovar. Recent studies showed that exposure to surface water seems to be a risk factor for *S. Napoli* infection. This study aims at describing the epidemiology, the molecular characteristics and reconstructing the phylogeography of *S. Napoli* in Northern Italy.

**Methods:** All *S. Napoli* cases in Lombardy Region between 2010 and 2016, reported from Enter-Net Italia, a network of diagnostic laboratories, were included in this study. A random sample of human isolates (10%, N=104) collected by the Regional Reference Laboratory in the period 2010-2016 were subtyped by Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE), according to standardized PulseNet protocol, with *Xba*I enzyme. Banding profile and clustering analysis was performed using the InfoQuest software. A total of 47 isolates were genotyped by Multi-Locus Sequence Typing (MLST), using previously described primers. Sequence types (STs) were assigned by comparison to the *S. enterica* MLST database. Forty-four *S. Napoli* strains isolated from human cases occurred in Lombardy and Emilia-Romagna between 2012-2014 were subjected to whole-genome sequencing (WGS), using the Illumina MiSeq platform. Bayesian SNP-based phylogeny was reconstructed using the kSNP software. The phylogenetic tree, model parameters, evolutionary rates demography models and phylogeography were co-estimated using a Bayesian Markov chain Monte Carlo (MCMC) method, implemented in the BEAST software. The significant migration rates were analysed and visualised using SPREAD. A comparative genomic analysis was performed to detect the differences between the *S. Napoli* genomes, in terms of nucleotide variations. Outbreak-related isolates were subjected to a genomic analysis based on sequence data for 93 core-genome loci, as described before, to define phylogenetic relationships of 15 *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotypes. Phylogenetic analysis was done using Maximum Likelihood method based on the Tamura-Nei model, using the Mega software.

**Results:** A total of 885 (6,8%) isolates of *S. Napoli* out of 12,962 *Salmonella* spp. isolates were reported from 2010 to 2016, with the highest isolation rates among infants (0-5 years, 48,9%). The average annual incidence rate was 1.29 per 100,000 inhabitants, and the highest incidence rates were observed in the provinces of Como, Lecco and Varese. It was clear that there was a dramatic increase in this serovar from June to October, each year. *S. Napoli* isolates compared by PFGE exhibited high levels of diversity (67 *Xba*I pulsotypes, 8 clusters). MLST analyses showed that all the isolates belong to the same ST474, and to eBURST group (eBG) 60. Phylogenetic analysis revealed that *S. Napoli* isolates subjected to WGS are grouped in two main clades, that strongly correlate with their geographic origin. Clade A (n=16 isolates) included most of the isolates from Emilia-Romagna, and clade B (n=28 isolates) comprised most of the isolates from Lombardy. The analysis of the tree confirmed the existence of two highly significant clades: one mainly including the isolates sampled in the Po Valley area (clade A, pp=0.92) and the other encompassing the Western Prealpes strains (clade B, pp=1). The sequences isolated in the Milan metropolitan area tended to be interspersed in both clades, forming only small subclades of no more than 3 sequences. The most probable location of the tree-root was in Po Valley region. The mean tMRCA of the tree-root was estimated to be 69 YA (95%HPD: 16-165 YA), corresponding to a mean 1945. Phylogeographic reconstruction showed that *S. Napoli* spreads simultaneously towards the North-West and the South-East. Northwest diffusion followed the courses of the Ticino and Adda rivers, reaching the metropolitan area of Milan as soon as the early 1950s and expanding to the Northern area until reaching in 2000s the region of the great lakes (in Lombardy). The Southeast dispersal apparently followed the Po River, reaching Piacenza in 1960s-1970s. In the late 1980s-1990s it reached the main centers of the Emilia Romagna region (Parma, Reggio Emilia, Modena) up to Bologna in the 2000s. Most external branches reached the area near the Adriatic Sea (Forlì) only recently (2014). The comparative genomics analysis revealed that *S. Napoli* belongs to Typhi subclade in clade A, being Paratyphi A the most related serovar. As for typhoid serotypes, *S. Napoli* genome lacks the  $\beta$ -glucuronidase gene and carries the invasive-determinant gene *cdtB* and the pathogenicity island SPI-18.

**Conclusions:** *S. Napoli* is an emerging public health concern, and the enigma of the increase in infections in Italy remains unexplained. One difference between *S. Napoli* and the other *Salmonella* serovars concerns the proportion of cases in the different age groups, with a significantly greater involvement of young children, possibly due to different exposure patterns.

For young children, foodborne exposure may be less important than other routes. The three most affected provinces (Como, Lecco and Varese) are characterized by the presence of lakes, and analysis of data from the literature revealed that surface water contamination may be a direct (waterborne infection) or indirect (foodborne infection) vehicle for transmission of *S. Napoli*. Regarding molecular characterization, *Xba*I restriction enzyme profiles indicated genomic heterogeneity among strains. PFGE involves random screening of the entire genome, while MLST analysis is limited to nucleotides within the targeted genes. Therefore, if there is little or no variation in the nucleotide sequence of the genes targeted by MLST, this technique can provide little or no discrimination between strains tested. Our study demonstrates that MLST, using the genes tested, lacks the ability to discriminate between *S. Napoli* isolates, and that PFGE can still be considered the method of choice for the molecular typing of this serotype. However, there are several disadvantages of using this technique. The technological advancements of Whole Genome Sequencing (WGS) provides the opportunity to access the entire genome information. In the present study, we compared *S. Napoli* isolates from two different Italian regions. The results indicate that WGS coupled to SNP-based phylogeny seems an excellent approach to infer the genomic and geographic distribution of serovar *Napoli*. Phylogeographic analysis showed that *S. Napoli* diffusion followed the courses of the Po, Ticino and Adda rivers, supporting the hypothesis according to which the surface waters seems to be a risk factor for *S. Napoli* infection. Genomic comparison revealed that *S. Napoli* belongs to Typhi subclade in clade A. A combination of SPI-18 island and *cdtB* gene was previously reported only in *S. Typhi*, *S. Paratyphi A* and clade B serotypes, all of them associated to elevated rates of invasive disease. Thus, to the best of our knowledge, this is the first time that a clade A nontyphoidal serotype presents the same virulence-genes pattern of *S. Typhi* and *S. Paratyphi A*. This result suggests that *S. Napoli* potential virulence deserves attention.

# INDICE

<b>1. INTRODUZIONE</b> .....	<b>6</b>
<b>1.1 Salmonella</b> .....	<b>7</b>
1.1.1 Caratteristiche microbiologiche .....	7
1.1.2 Tassonomia .....	8
1.1.3 Variabilità antigenica e sierotipizzazione .....	10
<b>1.2 Salmonellosi</b> .....	<b>11</b>
1.2.1 Patogenesi .....	11
1.2.2 Manifestazioni cliniche e terapia .....	15
1.2.3 Vie di trasmissione .....	17
1.2.4 Sistemi di sorveglianza ed epidemiologia .....	20
<b>1.3 Tipizzazione intraspecifica ed epidemiologia molecolare</b> .....	<b>25</b>
1.3.1 Metodi basati sulla restrizione enzimatica .....	26
1.3.2 Metodi basati sull'amplificazione genica .....	27
1.3.3 Metodi basati sul sequenziamento .....	27
1.3.4 <i>Whole-Genome Sequencing</i> (WGS) .....	28
1.3.5 Analisi filogenetiche .....	29
<b>1.4 <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> sierotipo Napoli</b> .....	<b>32</b>
<b>2. SCOPO</b> .....	<b>39</b>
<b>3. MATERIALI E METODI</b> .....	<b>42</b>
<b>3.1 Popolazione in studio</b> .....	<b>43</b>
<b>3.2 Tipizzazione mediante <i>Pulsed-Field Gel Electrophoresis</i> (PFGE)</b> .....	<b>42</b>
<b>3.3 Tipizzazione mediante <i>Multi-Locus Sequence Typing</i> (MLST)</b> .....	<b>44</b>
3.3.1 Estrazione del DNA .....	46
3.3.2 Amplificazione dei geni <i>thrA</i> , <i>purE</i> , <i>sucA</i> , <i>hisD</i> , <i>aroC</i> , <i>hemD</i> e <i>dnaN</i> .....	47

3.3.3 Rilevamento dei prodotti di PCR .....	48
3.3.4 Purificazione dei prodotti di amplificazione .....	48
3.3.5 Sequenziamento.....	49
3.3.6 Analisi dei dati di sequenza .....	50
3.3.7 <i>Editing</i> delle sequenze .....	50
3.3.8 Sottomissione delle sequenze nel <i>Salmonella enterica</i> MLST database .....	50
<b>3.4 Whole-Genome Sequencing .....</b>	<b>51</b>
<b>3.5 Analisi filogenetica mediante i metodi Bayesiani .....</b>	<b>52</b>
<b>3.6 Analisi filogeografica .....</b>	<b>54</b>
<b>3.7 Genomica comparativa.....</b>	<b>55</b>
<b>4. RISULTATI .....</b>	<b>57</b>
<b>4.1 Epidemiologia descrittiva .....</b>	<b>58</b>
<b>4.2 Epidemiologia molecolare .....</b>	<b>61</b>
4.2.1 Tipizzazione mediante <i>Pulsed-Field Gel Electrophoresis</i> (PFGE) .....	61
4.2.2 Tipizzazione mediante <i>Multi-Locus Sequence Typing</i> (MLST) .....	63
4.2.3 Analisi filogenetica mediante i metodi Bayesiani .....	64
4.2.4 Analisi filogeografica .....	65
4.2.5 Genomica comparativa .....	67
<b>5. DISCUSSIONE .....</b>	<b>69</b>
<b>6. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>78</b>
<b>7. SITOGRAFIA.....</b>	<b>91</b>

# 1. INTRODUZIONE

## 1.1 *Salmonella*

### 1.1.1 Caratteristiche microbiologiche



Figura 1. Morfologia di *Salmonella enterica* al microscopio elettronico a trasmissione.

Il genere *Salmonella*, appartenente alla famiglia delle *Enterobacteriaceae*, include microrganismi bastoncellari asporigeni Gram-negativi, aerobi-anaerobi facoltativi, catalasi positivi, ossidasi negativi, generalmente mobili per la presenza di flagelli peritrichi, ad esclusione di *Salmonella enterica* serovar Gallinarum e *Salmonella enterica* serovar Pullorum, che sono immobili (Figura 1) [D'Aoust J and Maurer J, 2007]. Gli stipiti di *Salmonella spp.*, classificati in due diverse specie (*Salmonella enterica* e *Salmonella bongori*), si sviluppano facilmente nei comuni terreni di coltura: le condizioni ottimali di crescita sono una temperatura di 37 °C e un valore di pH pari a 6.5-7.5, ma il microrganismo è in grado di moltiplicarsi tra i 2 e i 54 °C e a valori di pH compresi tra 3.8 e 9.5 [Adley CC and Ryan MP, 2016; D'Aoust J and Maurer J, 2007]. Il valore di attività dell'acqua ( $a_w$ ) necessaria per lo sviluppo deve essere almeno pari a 0.94 [Ryan MP et al., 2017]. Diversamente da quanto osservato per altri generi della famiglia delle *Enterobacteriaceae*, il congelamento in acqua e la presenza di alcune sostanze chimiche (ad esempio, verde brillante, tetrionato di sodio e sali biliari) non risultano inibenti nei confronti di *Salmonella spp.*; quest'ultima caratteristica è alla base di alcune tecniche per l'isolamento selettivo di questi microrganismi dalle feci [Ryan MP et al., 2017]. Il profilo biochimico tipico, che consente di differenziare il genere *Salmonella* dagli altri generi della stessa famiglia, è riportato nella Tabella 1, ma si deve considerare che esistono numerose varianti sia a livello di specie che di ceppo. [Ryan MP et al., 2017; D'Aoust J and Maurer J, 2007].

Tabella 1. Tipico profilo biochimico di *Salmonella*.

Reazione	Risultato
Produzione di indolo	-
Idrolisi dell'urea	-
Rosso metile	+
Voges-Proskauer	-
Riduzione dei nitrati	+
Fermentazione del glucosio con produzione di gas	+
Produzione di H <sub>2</sub> S	+
Fermentazione del lattosio	-
Fermentazione del saccarosio	-
Fermentazione della salicina	-
Fermentazione dell'adonite	-
Fermentazione del mannitolo	+
Fermentazione del maltosio	+
Fermentazione dell'inosite	-
Fermentazione del sorbitolo	+
Presenza dell'enzima gelatinasi	-
Sviluppo con NH <sub>4</sub> citrato	+
Sviluppo in presenza di KCN	-

### 1.1.2 Tassonomia

I batteri del genere *Salmonella* devono il suo nome al patologo veterinario statunitense D. E. Salmon, che per primo isolò, nel 1884, uno stipo dall'intestino di un suino, cui è stato inizialmente attribuito il nome di *Bacillus choleraesuis*, essendo ritenuto agente causale del colera suino. [Salmon DE et al., 1885]. Nel 1900, il batteriologo francese J. L. M. Lignières suggerì di cambiare il nome da *Bacillus* a *Salmonella*, in onore di Salmon [Ryan MP et al., 2017]. Da allora, si sono succedute numerosissime revisioni e modifiche del sistema di classificazione e molto si è dibattuto sul concetto di specie all'interno del genere *Salmonella* [Agbaje M et al., 2011]. Nell'evoluzione della nomenclatura, lungo tutto il XX secolo, possono sinteticamente essere individuate quattro fasi principali:

1. una prima classificazione si basava su criteri clinici e i nomi di specie dei diversi "tipi" di *Salmonella*, progressivamente individuati su base biochimica, facevano riferimento alla patologia di cui si presumeva fossero specificamente causa sia nell'uomo (ad esempio, *S. typhi*) che in determinati ospiti (ad esempio, *S. typhimurium*, *S. bovismorbificans*, *S. abortusequi*, ecc...) [Ryan MP et al., 2017];
2. a partire dagli anni '30 del secolo scorso, ad opera di White e poi soprattutto di Kauffmann, il riscontro della notevole varietà antigenica relativa agli antigeni somatici O e agli antigeni ciliari H, che caratterizza i membri del genere *Salmonella* (Schema di Kauffmann-White), ha indotto ad attribuire un nome di "specie" alle sempre più numerose siero-varianti

identificate, stabilendo che il nome dovesse corrispondere a quello della località geografica dove era stato segnalato il primo isolamento (ad esempio, *S. dublin*, *S. muenchen*, *S. london*). La classificazione sulla base della specificità O e H (approfondita nel paragrafo seguente) definiva, rispettivamente, sierogruppi e sierotipi all'interno del genere *Salmonella*, a sua volta suddiviso, su base biochimica, in quattro *subgenera* (I, II, III, IV) [Kauffmann F et al., 1966; D'Aoust J and Maurer J, 2007];

3. considerato che l'utilizzo della specificità antigenica quale criterio per la definizione della specie rappresentava oggettivamente un'anomalia tassonomica, la scuola americana è intervenuta negli anni '50-'60 del secolo scorso, nel tentativo di semplificare la classificazione, riponendo al centro le caratteristiche biochimiche e l'impatto delle diverse siero-varianti di *Salmonella* sulla patologia umana ed animale. In questa ottica, venivano riconosciuti solo tre specie appartenenti al genere *Salmonella*: *S. typhi*, *S. choleraesuis*, *S. enteritidis*, riconoscendo quindi dignità di specie solo ai sierotipi *typhi* e *choleraesuis* e comprendendo in un'unica specie, *S. enteritidis*, tutti gli altri sierotipi, ad eccezione di quelli di III subgenus secondo Kauffman, riclassificati in un genere diverso, denominato *Arizona* [Ewing WH, 1972; Ryan MP et al. 2017; D'Aoust J and Maurer J, 2007];
4. un definitivo chiarimento sulla nomenclatura del genera *Salmonella* è stato finalmente raggiunto nel 1982, con la pubblicazione dei risultati dell'analisi feno- e geno-tipica condotta da Le Minor e Popoff, in base alle quali tutti i sierotipi – un tempo inclusi nei quattro *subgenera* di Kauffman – appartengono ad un'unica specie, denominata *Salmonella enterica* [Le Minor L, Popoff MY, 1987]. La classificazione è riportata sinteticamente nella tabella 2: come si può notare, l'utilizzo di un nome proprio per identificare i sierotipi è ammesso solo per i sierotipi della subspecies *enterica*, più frequentemente implicati nella patologia umana, mentre i sierotipi appartenenti alle altre subspecies sono indicati con la formula antigenica. Tuttavia, se si considera che in base a queste osservazioni la denominazione corretta degli isolati appartenenti alla specie *S. enterica* implicherebbe una formula piuttosto complessa ed anche confondente, si è stabilito che, nell'uso corrente, è ammesso l'uso del termine binomiale *S. Typhi*, *S. Typhimurium*, *S. Derby*, ecc... con il nome del sierotipo in maiuscolo e non in corsivo, in quanto non si tratta di un nome di specie [Ryan MP et al., 2017; Su LH, Chiu CH].

L'attuale classificazione del genere *Salmonella* distingue 2 specie: *Salmonella enterica*, classificabile in 6 *subspecies* e in oltre 2600 sierotipi, e *Salmonella bongori*, identificata nel 1989, che include 22

sierotipi [Reeves MW et al., 1989]. Più recentemente, nel 2004, è stata identificata una terza specie, *Salmonella subterranea* [Shelobolina ES et al., 2004], la quale, tuttavia, non sembra rispettare i criteri di appartenenza al genere [Grimont PA and Weill FX, 2007].

Nel 2007, Grimont e Weill hanno proposto che lo schema che classifica i sierogruppi/sierotipi di *Salmonella* venisse chiamato Schema di White-Kauffman-Le Minor [Grimont PA and Weill FX, 2007].

Tabella 2. La classificazione attuale del genere *Salmonella*.

Genere <i>Salmonella</i>		Corrispondenza con lo schema di Kauffmann-White	N° sierotipi	Habitat naturale	Esempi di sierotipi
Specie <i>S. enterica</i>					
	subsp. <i>enterica</i> (I)	I subgenus	1586	Vertebrati a sangue caldo (uomo incluso)	Typhi, Typimurium, Enteritidis
	subsp. <i>salamae</i> (II)	II subgenus	522	Vertebrati a sangue freddo e ambiente	9,46;z:z39
	subsp. <i>arizonae</i> (IIIa)	III subgenus	102		43:z29:-
	subsp. <i>diarizonae</i> (IIIb)		308		6,7:l,v:1,5,7
	subsp. <i>houtanae</i> (IV)	IV subgenus	76		21:m,t:-
	subsp. <i>indica</i> (VI)	non definibile	13		59:z36:-
Specie <i>S. bongori</i>	subsp. V	V subgenus	22		

### 1.1.3 Variabilità antigenica e sierotipizzazione

I batteri del genere *Salmonella* sono dotati di un complesso mosaico antigenico [D'Aoust J and Maurer J, 2007] che include:

- antigeni O (somatici), di natura polisaccaridica, combinati con un lipide a formare un complesso lipopolisaccaridico, resistono alla temperatura di 100 °C fino a 2 ore, all'alcool, al fenolo e all'acetone [Ryan MP et al., 2007]. Nello schema di Kauffmann-White i sierogruppi sono definiti in base alla specificità dell'antigene somatico ed in origine indicati con lettere maiuscole dalla A alla Z e quindi con i numeri da 51 a 67; oggi si preferisce identificarli direttamente con il numero corrispondente al loro principale antigene somatico, da O:2 a O:67;
- antigeni H (ciliari o flagellari), di natura proteica, vengono denaturati alla temperatura di 100 °C e sono sensibili all'alcool ma non al formolo. Ciascun isolato può presentare una o due distinte specificità ciliari (sierotipi monofasici o difasici); molto raramente sono osservati

sierotipi trifasici. Gli antigeni H di fase 1 vengono indicati da lettere alfabetiche minuscole (a, b, c, z,...), mentre quelli di fase 2 vengono indicati da numeri arabi e lettere (1, 2, 3, e, n, x,...);

- antigeni K (capsulari), sono di natura polisaccaridica, denaturati dalla temperatura di 60 °C per un'ora. Il più noto è l'antigene Vi (da virulenza), tipico di *S. Typhi*, ma presente anche in *S. Paratyphi C* e *S. Dublin*.

Sulla base della composizione antigenica O-H-K, la classificazione dei diversi sierotipi, messa a punto negli anni '30 del secolo scorso da White e Kauffmann, descrive la formula antigenica caratterizzante ciascun sierotipo indicando in sequenza le specificità O, H di fase 1 e H di fase 2 e separando le tre parti con i due punti (alcuni esempi sono riportati nella Tabella 2) [Kauffmann F, 1966; Ryan MP et al., 2007].

La classificazione dei sierotipi di *Salmonella* secondo lo schema di White-Kauffmann-Le Minor è soggetta ad aggiornamenti annuali curati dal *Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella* dell'Organizzazione Mondiale della Sanità presso l'Istituto Pasteur di Parigi, con cui collaborano vari laboratori di riferimento internazionali. L'ultimo aggiornamento risale al 2014 e riporta l'esistenza di 2659 sierotipi nel genere *Salmonella*: 2639 in *S. enterica* e 22 in *S. bongori* [Ryan MP et al., 2017; Issenhuth-Jeanjean S et al., 2014].

## **1.2 Salmonellosi**

Con il termine "salmonellosi" si designano tutte le affezioni sostenute da batteri del genere *Salmonella*, che possono manifestarsi con due principali quadri clinici: le infezioni enteriche, localizzate a livello dell'intestino a decorso generalmente benigno, e la febbre tifoide (e paratifoide), patologia severa a carattere sistemico [D'Aoust J and Maurer J, 2007; Uche IV et al., 2017]. Mentre la febbre tifoide rappresenta una patologia ormai sporadica nei Paesi occidentali, le salmonellosi non tifoidee sono tra le più frequenti patologie di origine alimentare sia nei Paesi industrializzati che in quelli a più basso reddito [Majowicz SE et al., 2010].

### **1.2.1 Patogenesi**

La patogenesi delle infezioni da *Salmonella* è un fenomeno complesso e multifattoriale. Il manifestarsi o meno della sintomatologia clinica in seguito d'ingestione di alimenti contaminati dipende da molti fattori, quali il numero di batteri ingeriti, la virulenza del ceppo e le condizioni dell'ospite. *Salmonella* spp. possiede diversi fattori di virulenza, necessari ad attuare tutte le varie fasi dell'infezione: sistemi di difesa che permettono la sopravvivenza in ambienti a pH acido, utili per superare la barriera gastrica; fattori che intervengono al momento della colonizzazione

dell'intestino, permettendo al batterio di aderire alle cellule del lume intestinale [Bäumler AJ et al., 1997]; fattori che consentono di attraversare l'epitelio intestinale a livello delle placche di Peyer o di sopravvivere nei macrofagi [Gunn JS et al., 2000]. Ognuno di questi fattori è codificato da geni di virulenza localizzati per lo più in loci cromosomali specifici, denominati isole di patogenicità (indicate con l'acronimo SPI), altri sono invece associati a plasmidi di virulenza [D'Aoust J and Maurer J, 2007]. Le isole di patogenicità sono i principali protagonisti dell'invasione tissutale e, tra queste, SPI-1 e SPI-2 sono le più studiate e quelle di cui si conoscono meglio struttura e funzioni: SPI-1 è principalmente implicata nei processi di invasione delle cellule non-fagocitarie dell'intestino, mentre SPI-2 ha come principale funzione quella di agevolare un'infezione sistemica e di permettere la sopravvivenza e la moltiplicazione del batterio all'interno dei macrofagi [Hensel M, 2004; Sabbagh SC et al., 2010; Ehrbar K et al., 2003]. Nelle due isole di patogenicità SPI-1 e 2 sono localizzati i geni che codificano per le proteine coinvolte nella formazione del Sistema di Secrezione di Tipo III (*Type Three Secretion System*, TTSS), un complesso macromolecolare strutturalmente simile ai flagelli con cui i batteri patogeni Gram-negativi trasportano proteine effettrici dal citosol batterico all'interno del citoplasma della cellula eucariotica. È stato dimostrato che i batteri del genere *Salmonella* possiedono due sistemi TTSS, denominati TTSS-1 e TTSS-2 [Hensel M, 2004; Velge P et al., 2012]. A livello intestinale, le salmonelle possono essere catturate direttamente dal lume intestinale da parte di cellule fagocitarie CD18+, le quali, estendendo i dendriti fra le giunzioni di due enterociti, catturano le cellule batteriche presenti nel lume intestinale e le trasportano nella lamina propria e, successivamente, verso fegato e milza, per via linfo-ematogena (Figura 2).

I batteri del genere *Salmonella* sono caratterizzati dalla capacità di invadere sia le cellule M delle placche di Peyer che gli enterociti, tramite il sistema TTSS-1. Mediante TTSS-1, essi traslocano nel citoplasma delle cellule invase particolari proteine effettrici denominate *Sop* (*Salmonella outer proteins*), quali SopE, SopE2, SopD e SopB. Le proteine *Sop* si sono rivelate fattori chiave nel determinare la virulenza di *Salmonella* e svolgono, essenzialmente, due funzioni principali: alterano la fisiologia della cellula ospite, determinando una modificazione nella struttura del citoscheletro della cellula eucariotica (*ruffling*), che permette l'internalizzazione della cellula batterica; stimolano la secrezione di fluidi nel lume intestinale, in conseguenza della risposta infiammatoria. SopB è una inositolo-fosfato fosfatasi, codificata da SPI-5, che provoca infiammazione intestinale e induce l'innalzamento dei livelli cellulari di inositolo 1,4,5,6-tetrafosfato, con conseguente perdita di ioni cloro e secrezione di fluidi nel lume intestinale, con conseguente diarrea [Velge P et al, 2012; Ehrbar

K et al., 2003]. SopE ha la funzione di provocare una massiccia polimerizzazione di actina, per favorire l'ingresso del batterio nella cellula eucariotica [Ehrbar K et al., 2003].

Una volta penetrati negli enterociti, i batteri continuano l'esportazione di proteine effettrici tramite il sistema TTSS-2, e determinano la formazione di una particolare struttura, chiamata *Salmonella containing vacuole* (SCV), che ha una funzione di protezione dall'azione tossica dei leucociti [Steele-Mortimer O, 2008].

La colonizzazione e l'invasione della mucosa intestinale stimolano la migrazione transepiteliale di linfociti T helper 1, con conseguente liberazione di IFN- $\gamma$  e altre citochine infiammatorie, che sono rilevabili nel siero di soggetti infetti [Mizuno Y et al., 2003; Stoycheva M and Murdjeva M., 2005]. L'espressione di tali citochine comporta il reclutamento e l'attivazione di macrofagi e cellule dendritiche e un significativo afflusso di granulociti neutrofili all'interno del lume intestinale, fenomeno tipico delle gastroenteriti causate dalle salmonellosi non tifoidee [Gal-Mor O et al., 2014]. I batteri, all'interno del SCV, raggiungono la lamina propria, dove vengono fagocitati dai macrofagi (Figura 2).

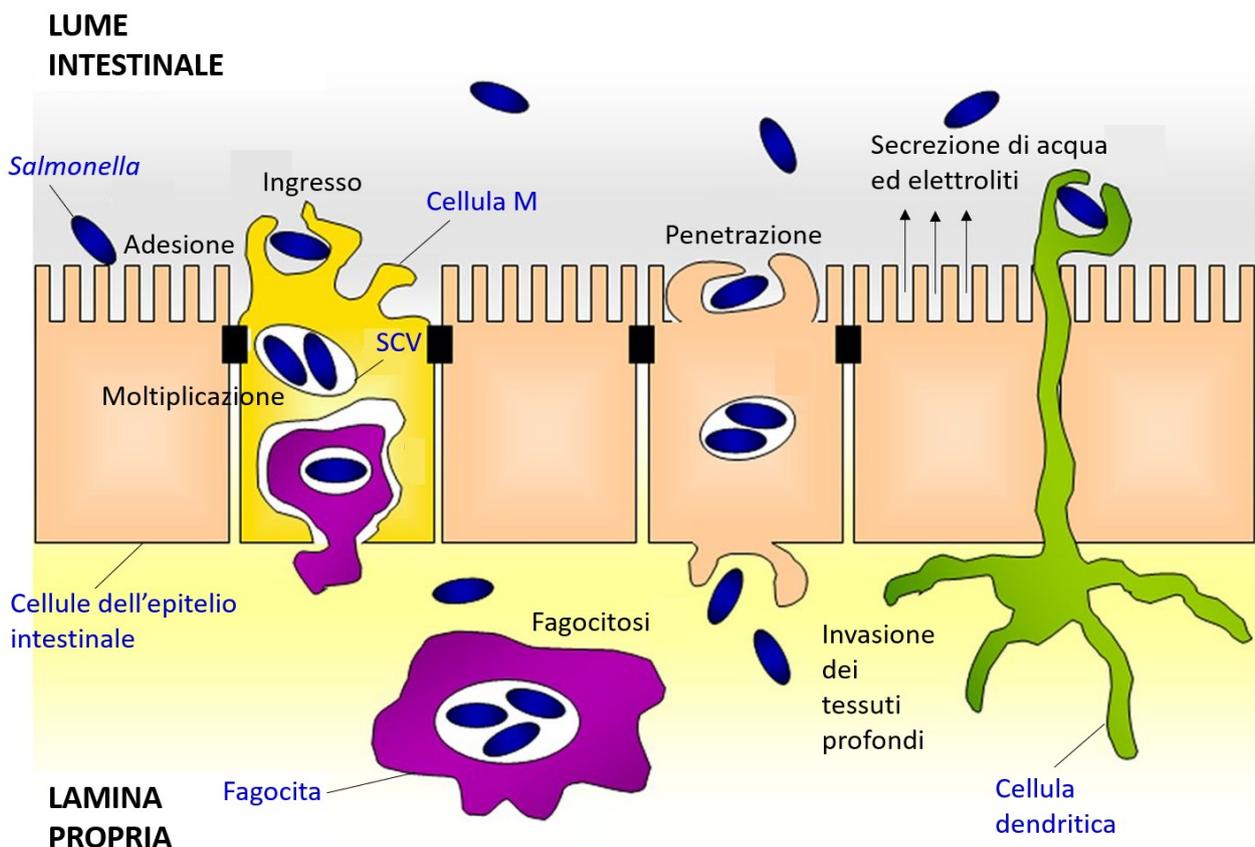


Figura 2. Patogenesi delle infezioni da parte dei sierotipi non tifoidei [Fàbrega A and Vila J, 2013, modificata].

A questo punto, intervengono le proteine effettrici codificate dai geni plasmidici *spv* (*Salmonella plasmid virulence*) A, B, C, D e R, la cui funzione è quella di favorire la sopravvivenza del batterio

all'interno dei macrofagi. In particolare, *spvB* e *spvC* vengono traslocate nel citoplasma dei macrofagi attraverso il TTSS-2, e inibiscono il richiamo di NADPH-ossidasi a livello della membrana del fagosoma prevenendo (o riducendo) la produzione di radicali superossidi nel SCV, promuovendo la produzione di fattori pro-apoptotici e inibendo quella di fattori anti-apoptociti. Inoltre, viene ridotta la produzione di citochine e di fattori dell'infiammazione, in modo tale da impedire l'attivazione dei macrofagi, che vanno quindi incontro a morte prima di avere potuto esercitare la loro azione litica sui batteri, e vengono fagocitati da nuovi macrofagi.

A differenza delle salmonellosi non tifoidee, che comportano, generalmente, un'infezione localizzata a livello della mucosa intestinale, nel caso della febbre tifoide l'infezione evolve in forma invasiva (Figura 3).

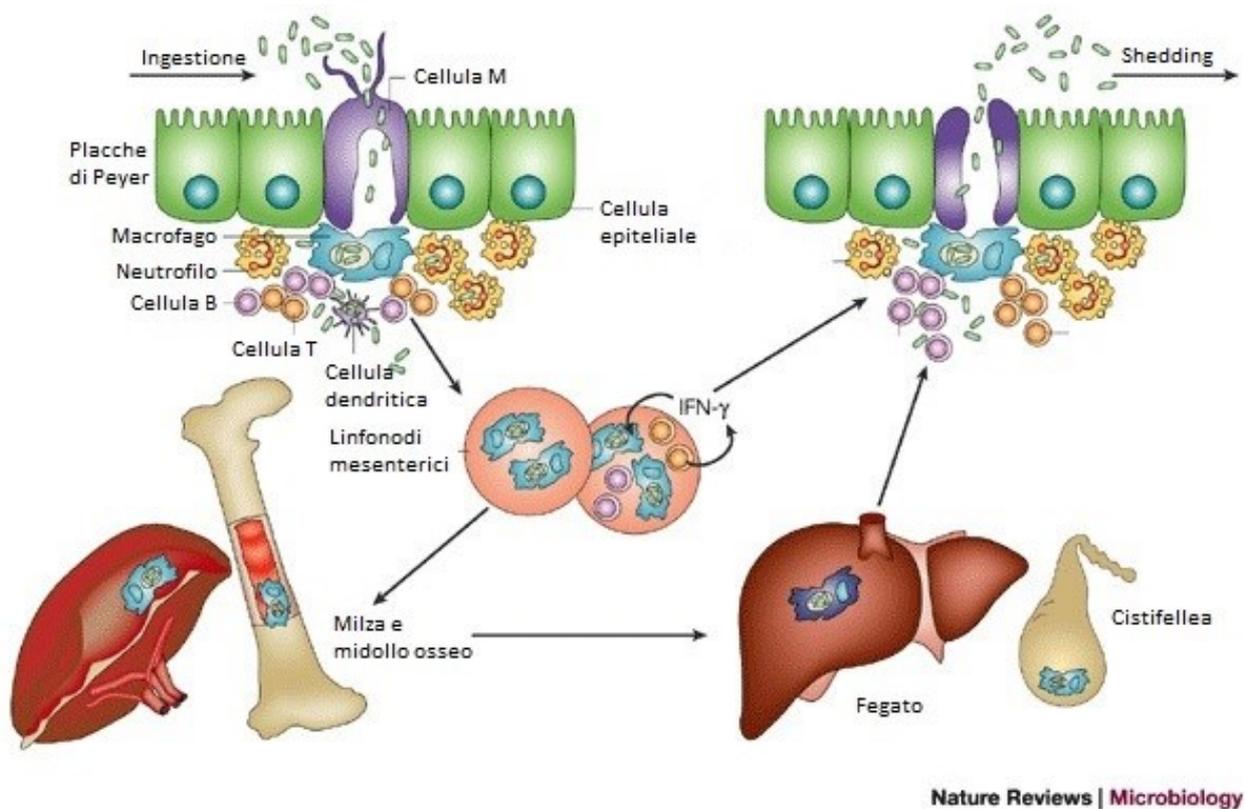


Figura 3. Patogenesi delle infezioni da *Salmonella* [Kaur J et al., 2012, modificata].

Attraverso la via linfatica, i batteri superano i linfonodi mesenterici e, mediante il dotto toracico, giungono nel torrente circolatorio, provocando una prima batteriemia transitoria, che viene interrotta dai macrofagi del fegato e della milza. In queste sedi, tuttavia, i meccanismi di difesa non sono in grado di assicurare una completa inibizione e quindi la moltiplicazione del patogeno prosegue e determina una seconda fase batteriemia persistente che, con la comparsa dei primi sintomi, corrisponde all'esordio della sintomatologia clinica. Successivamente, i batteri raggiungono

la colecisti e, da qui, si riversano nuovamente nell'intestino, il cui tessuto linfoide (placche di Peyer e follicoli linfatici solitari) è coinvolto in una reazione infiammatoria e in un'infiltrazione di linfociti e di cellule istiocitarie, seguite da necrosi, desquamazione e formazione di caratteristiche ulcere tifoidi [D'Aoust J and Maurer J, 2007; Zhang S et al., 2003].

Nel caso delle salmonellosi non tifoidee, la dose minima infettante necessaria per provocare la malattia è ipotizzata tra  $10^5$  e  $10^6$  cellule, ma può variare nei diversi sierotipi e in dipendenza delle condizioni dell'ospite [Blaser MJ and Newman LS, 1982; Cianflone NFC, 2008]. L'ingestione di dosi elevate di microrganismi è generalmente associata ad una ridotta durata della malattia e a manifestazioni cliniche più gravi [Cianflone NFC, 2008]. In letteratura è riportato che, in alcuni casi, l'ingestione di  $10^2$ - $10^3$  batteri è sufficiente per causare la patologia, in modo particolare nei pazienti con basso pH gastrico, nei neonati e nei soggetti che fanno uso di farmaci antiacidi [Cianflone NFC, 2008]. Evidenze epidemiologiche mostrano come le infezioni da sierotipi non tifoidei, soprattutto di tipo invasivo, siano spesso associate a soggetti immunocompromessi e, in modo particolare, a individui affetti da HIV [Gordon MA, 2008]. Studi presenti in letteratura hanno dimostrato, inoltre, come pazienti che presentano deficienze ereditarie del sistema IL-12/IL-23 risultino essere particolarmente suscettibili alle infezioni da sierotipi non tifoidei ma non alle infezioni da sierotipi tifoidei [MacLennan C et al., 2004; Van de Vosse E et Ottenhoff TH, 2006]. Tali osservazioni supportano l'ipotesi che salmonellosi non tifoidee e tifoidee divergano tra loro, oltre che per le caratteristiche antigeniche ed epidemiologiche, anche per i *pathway* infiammatori di cui sono responsabili [Gal-Mor O et al., 2014].

### **1.2.3 Manifestazioni cliniche e terapia**

L'infezione da parte dei sierotipi non tifoidei può essere asintomatica (stato di portatore) [McGovern VJ et Slavutin LJ, 1979; Glynn JR et Palmer SR, 1992], ma frequentemente si manifesta come un'enterocolite acuta con inizio da 6 a 72 ore dopo il contagio [Gal-Mor O et al., 2014]. I sintomi più comuni sono mal di testa, dolori addominali, diarrea, nausea, vomito, frequentemente accompagnati da febbre (38-39 °C) [Gal-Mor O et al., 2014; Buchwald DS, Blaser MJ, 1984]. Il quadro clinico si risolve, in genere, nello spazio di 4-5 giorni. In qualche caso, tuttavia, la febbre e le alterazioni dell'alvo si prolungano per 10-15 giorni [Gal-Mor O et al., 2014]. Dopo la guarigione può insorgere un'artrite reattiva (sindrome di Reiter) che si verifica, nella maggior parte dei casi, in soggetti con antigene di istocompatibilità HLA-B27 [Jones MB et al., 1979; Dworkin MS et al., 2001]. Durante la fase di convalescenza, è comune che l'escrezione di *Salmonella* si prolunghi fino a 1 mese

dopo l'infezione per gli adulti, mentre nei bambini con età inferiore ai 5 anni, l'espulsione di batteri tramite le feci può durare fino a 7 settimane [Gal-Mor O et al., 2014; Buchwald DS et al., 2001]. Generalmente, le gastroenteriti da salmonellosi non tifoidee guariscono spontaneamente. Le infezioni lievi non necessitano della somministrazione di antibiotici, la terapia si basa sulla correzione della disidratazione e degli eventuali squilibri elettrolitici. Allo scopo di prevenire complicanze, la terapia antibiotica appare indicata per i pazienti che rappresentano particolari categorie a rischio, come i neonati, i soggetti immunocompromessi e i soggetti con alterazioni endovascolari [Cianflone NFC, 2008]. Alcuni lavori in letteratura riferiscono che il trattamento con antibiotici può prolungare l'escrezione di batteri tramite le feci [Aserkoff B, Bennett JV, 1969; Murase T et al., 2000; Gal-Mor O et al., 2014], tuttavia i risultati di questi studi sono piuttosto controversi [Gal-Mor O et al., 2014; Hohmann EL, 2001].

La batteriemia è la complicanza più comune della gastroenterite, e si verifica in circa l'1-4% dei soggetti immunocompetenti [Buchwald DS, Blaser MJ, 1984; Hohmann EL, 2001]. I pazienti con infezione da HIV risultano a maggior rischio di sviluppare batteriemia, così che le batteriemie ricorrenti da *Salmonella* rappresentano un criterio per definire la diagnosi di sindrome da immunodeficienza acquisita (AIDS) [Cianflone NFC, 2008].

La febbre tifoide è una patologia sistemica, con un periodo di incubazione medio di 14 giorni [Gal-Mor O et al., 2014]. I sintomi, che possono persistere fino a 3 settimane, includono febbre elevata (39-40 °C), brividi, dolori addominali, epatosplenomegalia, esantemi maculari sulla cute addominale (denominati roseole), nausea, costipazione, mal di testa e tosse secca [D'Aoust J and Maurer J, 2007; Gal-Mor O et al., 2014]. Le complicanze entero-emorragiche di vario grado o, meno frequentemente, la perforazione intestinale si verificano nella terza settimana di malattia. Complessivamente, il quadro clinico causato da *S. Typhi* è caratterizzato da sintomi più severi e più prolungati, rispetto a quelli dovuti ai sierotipi paratifoidei, senza tuttavia consentire una diagnosi differenziale su base clinica [Nguyen QC et al., 2004].

Nel caso di infezioni invasive sostenute da sierotipi non tifoidei, solitamente associate a pazienti affetti da immunodeficienze, la sintomatologia appare molto simile a quella della febbre tifoide: febbre alta, epatosplenomegalia, complicazioni respiratorie, con sintomi intestinali spesso assenti, e possibili localizzazioni extra-intestinali [Gal-Mor O et al., 2014]. Qualsiasi organo e apparato può essere coinvolto. Le vie urinarie rappresentano la sede extra-intestinale più frequentemente interessata, ma si deve ricordare che in relazione alla capacità di infettare le strutture endovascolari, la batteriemia da *Salmonella* può portare allo sviluppo di endocarditi, soprattutto in presenza di

lesioni valvolari preesistenti. L'infezione coinvolgente il sistema nervoso centrale può manifestarsi con quadri di meningite, ventriculite, ascesso cerebrale o empiema subdurale. Altra sede di localizzazione relativamente frequente del patogeno è l'apparato osteoarticolare, con quadri di artrite settica e osteomieliti [Cianflone NFC, 2008].

#### 1.2.4 Vie di trasmissione

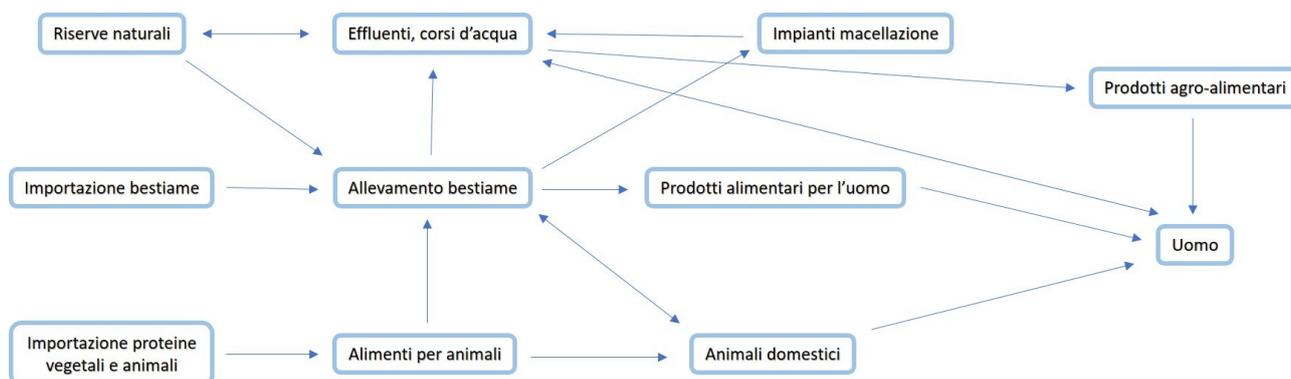


Figura 4. Circuito di contagio delle salmonellosi non tifoidee.

Mentre la trasmissione della febbre tifoide riconosce come unica fonte di infezione l'uomo (malato o portatore) e il contagio è quindi strettamente riconducibile al circuito oro-fecale, le salmonellosi non tifoidee sono zoonosi, ovvero patologie che possono essere trasmesse direttamente o indirettamente tra animali e ospite uomo. Si è stimato che l'infezione per l'uomo è di origine alimentare nel 95% dei casi [Cianflone NFC, 2008]. Molti sierotipi non tifoidei, come ad esempio *S. Typhimurium*, sono considerati ubiquitari, essendo in grado di infettare un ampio spettro di ospiti appartenenti a specie differenti, ma sono stati anche riconosciuti sierotipi che risultano adattati ad un solo specifico ospite o a uno spettro più ristretto: sono un esempio *S. Dublin* nei bovini, *S. Abortusequei* nei cavalli, *S. Gallinarum* e *S. Pullorum* nel pollame [Silva C et al., 2014; Agbaje M et al., 2011]. Queste differenti caratteristiche nelle modalità di trasmissione comportano, di conseguenza, un differente quadro epidemiologico della febbre tifoide rispetto a quello delle infezioni non tifoidee. La febbre tifoide è endemica nei Paesi in via di sviluppo, in quanto la carenza di acqua potabile e le pessime condizioni igienico-sanitarie favoriscono la diffusione di *S. Typhi*, tramite il consumo o acqua contaminata o di alimenti che possono subire la contaminazione fecale (vegetali provenienti da colture irrigate con acque superficiali contaminate o frutti di mare raccolti in aree marine contaminate da liquami). Nel caso delle salmonellosi non tifoidee, la catena di contagio si presenta di notevole complessità, coinvolgendo un ampio spettro di animali-serbatoio, differenti veicoli alimentari, sia di origine animale che vegetale, e anche l'ambiente (Figura 3) [Silva C et al., 2014; Cianflone NFC, 2008]. Sebbene la maggior parte dei casi di salmonellosi non tifoidea

sia di tipo *foodborne*, l'infezione può anche essere acquisita attraverso il contatto diretto o indiretto con gli animali (in fattoria o animali domestici) [Cummings KJ et al., 2012], per via idrica o anche per contagio interumano o infezione nosocomiale [Cianflone NFC, 2008].

I principali veicoli alimentari di infezione sono la carne, le uova e il latte, ma la diffusione ubiquitaria e la capacità di crescita dei batteri del genere *Salmonella* a temperature comprese fra 2 e i 54 °C fa sì che qualsiasi alimento manipolato o conservato in modo non corretto possa essere veicolo di infezione [Cianflone NFC, 2008]. Molti episodi sono causati dal tempo prolungato intercorso fra la preparazione, la cottura dell'alimento e il consumo, che favorisce la moltiplicazione dei batteri, l'aumento della dose infettante e quindi una maggiore probabilità di causare infezione, che può anche così risultare più grave. Anche il ruolo degli operatori della catena alimentare può essere rilevante, in quanto è stato dimostrato che una non corretta manipolazione di materie prime contaminate può causare una contaminazione ambientale che, anche in conseguenza dell'elevata capacità dei batteri del genere *Salmonella* di sopravvivere nell'ambiente, può essere causa di contaminazione e cross-contaminazione di alimenti.

La contaminazione della carne si stabilisce con modalità diverse, la presenza dei batteri è generalmente causata da contaminazione fecale, ed è direttamente proporzionale all'entità dell'infezione nell'animale e alle carenze igieniche in fase di macellazione. La contaminazione a livello delle masse muscolari è di solito infrequente, ma aumenta in seguito ai processi di lavorazione per la produzione di carni macinate o insaccati freschi. Pertanto, questi prodotti, se non sufficientemente cotti o stagionati, possono divenire veicoli di infezione. Nelle carni avicole, la contaminazione da *Salmonella* dipende principalmente dalle modalità di allevamento del pollame. Ogni allevamento può contenere migliaia di capi, e questa concentrazione di potenziali ospiti fornisce l'opportunità di diffondere l'infezione tra gli animali in modo estremamente rapido. La stessa condizione si ritrova durante il trasporto dall'allevamento al macello, che avviene sempre in condizione di sovraffollamento. Nel corso della macellazione, poi, i batteri possono passare da una carcassa all'altra, in seguito ai fenomeni di contaminazione crociata che si verificano durante la lavorazione [D'Aoust J and Maurer J, 2007].

Le uova e i prodotti derivati rappresentano la principale fonte di infezione per l'uomo, essendo la causa di circa il 50% dei focolai di *Salmonella*, soprattutto da parte di *S. Enteritidis* [EFSA and ECDC, 2016; Whiley H et al., 2015]. Entrambi i sierotipi hanno la capacità di colonizzare gli organi riproduttivi delle galline. La contaminazione dell'uovo può avvenire nell'ovaio per trasmissione verticale, nella cloaca, e al momento della deposizione, principalmente in seguito a contaminazione

fecale dei nastri di trasporto delle uova [Whiley H et al., 2015]. Negli ultimi due casi, i batteri si trovano sulla superficie del guscio e possono penetrare nell'uovo in seguito a microlesioni del guscio stesso o attraverso i pori che permettono gli scambi gassosi fra l'esterno e l'interno. La penetrazione del patogeno nelle uova viene facilitata dalla presenza di umidità sulla superficie delle uova stesse, che modifica la tensione superficiale [De Reu K et al., 2006]. Questo fenomeno è alla base della decisione della Commissione Europea di non rendere obbligatoria la refrigerazione delle uova durante la fase di commercializzazione, al fine di evitare che eventuali interruzioni della catena del freddo possano provocare la formazione di condensa sul guscio, facilitando la penetrazione di microrganismi eventualmente presenti sulla sua superficie [EFSA BIOHAZ Panel (EFSA Panel on Biological Hazards), 2014]. All'interno dell'uovo, la contaminazione si localizza a livello della membrana vitellina e dello strato di albume che la circonda. Nelle uova fresche il numero di batteri del genere *Salmonella* presente è estremamente basso e, essendo l'albume un substrato povero di ferro, la moltiplicazione dei microrganismi avviene solamente in seguito a penetrazione degli stessi nel tuorlo, come effetto di variazioni nella permeabilità della membrana vitellina. Tali variazioni avvengono in modo direttamente proporzionale al tempo e alla temperatura di conservazione: in uova contaminate conservate a temperature inferiori a 20 °C, l'invasione del tuorlo comincia dopo circa tre settimane, mentre a temperature comprese fra 20 e 30 °C la crescita microbica avviene rapidamente, nel giro di pochi giorni. Da tali considerazioni emerge l'importanza della temperatura di conservazione delle uova come fattore critico [Whiley H et al., 2015].

Oltre ai più comuni alimenti di origine animale, numerosi episodi sono stati associati ad alimenti particolari, anche di origine vegetale, come l'epidemia che si verificò in Inghilterra e nel Galles, tra il 1994 e il 1995, a causa di uno snack a base di mais contaminato da *S. Agona* [Killalea D et al., 1996] e quella causata da germogli di soia contaminati da *S. Saintpaul*, verificatasi nel 1988, nel Regno Unito [O'Mahoney M et al., 1990]. Anche prodotti a base di cioccolato, considerato un alimento "sicuro" che grazie al basso tenore in acqua libera ( $a_w$ ), hanno causato focolai epidemici rilevanti di salmonellosi: tra il 1973 e il 1974, in Canada e negli Stati Uniti, si è verificata un'epidemia causata da palline di cioccolato contaminate da *S. Eastbourne* [Craven PC et al., 1975], mentre nel 1982 si è verificata un'epidemia in Inghilterra e in Galles, associata alla presenza di *S. Napoli* in barrette di cioccolato di origine italiana [Gill ON et al., 1983]. Il dato interessante di entrambi gli episodi è la dose infettante estremamente bassa, se confrontata con quella normalmente associata all'infezione da *Salmonella*, spiegabile dall'effetto protettivo dell'alimento, particolarmente ricco in sostanze lipidiche, nei confronti dell'acidità gastrica [Craven PC et al., 1975; Gill ON et al., 1983].

Sebbene gli animali e gli alimenti di origine animale rappresentino i veicoli principali dei batteri del genere *Salmonella*, essi sono riscontrate anche nell'ambiente (acque, suolo, alimenti di origine vegetale) grazie alla contaminazione attraverso le feci sia di origine umana che animale [D'Aoust J and Maurer J, 2007]. L'ambiente rappresenta un ottimo serbatoio di mantenimento per molti sierotipi, anche per quelli che normalmente non sono riscontrati negli animali da allevamento e nell'uomo. *Salmonella* è molto comune nelle acque reflue, attraverso le quali può diffondersi in ambienti acquatici come torrenti, fiumi, laghi e rappresentare una fonte di contaminazione del suolo e di conseguenza anche dei vegetali [Lemarchand K et al., 2002]. L'utilizzo delle acque reflue per irrigazione rappresenta una fonte diretta di contaminazione, che è favorita da vegetali con denso fogliame in quanto proteggono i microrganismi dall'esposizione a fattori ambientali quali radiazioni solari, temperature elevate ed essiccamento, e offre loro una superficie ottimale di crescita [Lemarchand K et al., 2002]. Anche gli animali al pascolo inducono una contaminazione diretta del suolo, che può causare la contaminazione fino ai bacini idrici [Melloul AA et al., 2001].

#### **1.2.5 Sistemi di sorveglianza ed epidemiologia**

La prevenzione delle Malattie Trasmissibili di origine Alimentare (MTA) costituisce una priorità per l'Unione Europea (UE) e richiede un approccio coordinato tra gli Stati Membri. La Decisione n° 2119/98/CE del Parlamento Europeo istituisce una rete di sorveglianza epidemiologica e di controllo delle malattie trasmissibili nell'UE che, con il supporto della Commissione Europea, promuove la cooperazione e il coordinamento tra gli Stati Membri al fine di migliorare la prevenzione e il controllo di tali malattie. Gli Stati Membri, secondo quanto disposto dalla Decisione n° 2000/96/CE, hanno il compito di raccogliere e trasmettere i dati di sorveglianza relativi ai casi di infezione da patogeni trasmessi da alimenti allo *European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC)*. Tra le malattie a trasmissione alimentare sottoposte a sorveglianza, vi sono le infezioni da *Salmonella*, *Campylobacter*, *Escherichia coli* produttori di Shiga-tossina (*Shiga-toxin producer Escherichia coli*, STEC), *Listeria*, *Shigella* e *Yersinia*. Parallelamente, la *European Food Safety Authority (EFSA)* raccoglie, attraverso gli Stati Membri, i dati sulla prevalenza dei patogeni di origine zoonotica negli alimenti e nelle popolazioni animali serbatoio, nonché i dati sui focolai epidemici di malattie a trasmissione alimentare, secondo i principi e le priorità della Direttiva 2003/99/CE, recepita in Italia dal Decreto Legislativo 191/2006 "Sorveglianza, monitoraggio e controllo delle zoonosi, degli agenti zoonotici e dei focolai di tossinfezione alimentare".

Il ruolo dei laboratori nella sorveglianza, prevenzione e controllo delle MTA è essenziale: se per la diagnosi è sufficiente l'identificazione del patogeno dai campioni biologici prelevati da un sospetto

caso di malattia, per poter identificare il veicolo alimentare e la fonte di contaminazione dell'alimento coinvolto sono necessarie ulteriori caratterizzazioni del ceppo, mediante tecniche di biologia molecolare. In aggiunta, la tipizzazione fenotipica e genotipica degli agenti eziologici rappresenta uno strumento indispensabile per identificare tempestivamente i pericoli emergenti. L'analisi su vasta scala dei dati relativi agli isolamenti dei patogeni da fonti umane e non umane ha implementato la capacità di lettura d'insieme dei *trend* epidemiologici delle infezioni da *Salmonella* e dagli altri patogeni trasmessi da alimenti. Ciò consente di analizzare le tendenze epidemiologiche osservate nella popolazione umana, nel tempo e nelle diverse aree geografiche, e di correlarle con quelle osservate negli alimenti e negli animali serbatoio. Dal 2007, la sorveglianza delle MTA nella UE è coordinata dall'ECDC nell'ambito di un programma specifico, denominato *Foodborne and Waterborne Diseases (FWD)*, che raccoglie periodicamente attraverso gli Stati Membri le notifiche dei casi di infezione, definiti secondo criteri standard. Il programma FWD dell'ECDC, dedicato alle malattie trasmesse da alimenti e acqua, include la sorveglianza dei casi umani di infezione causati da numerosi agenti patogeni. Tra questi, le infezioni considerate di importanza prioritaria sono quelle associate a *Brucella* spp., *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp., *Listeria* spp., *Shigella* spp., STEC e *Yersinia* spp. Le attività di sorveglianza si articolano attraverso la raccolta dei dati nel sistema TESSy (*The European Surveillance System*), che ha il duplice obiettivo di stimare l'incidenza dei casi di infezione associati ai diversi patogeni nel corso del tempo e nei diversi Stati Membri, fornire informazioni sulle caratteristiche dei casi d'infezione, compresi i fattori di rischio e permettere una descrizione dettagliata e completa delle caratteristiche fenotipiche e genotipiche dei ceppi batterici ad essi associati.

La sorveglianza delle MTA nella UE è completata dal sistema di allerta EPIS (*Epidemic-intelligence and information System*), attivo dal 2010, dedicato a creare tra gli Stati Membri una rete per la segnalazione rapida e lo scambio di informazioni sulle situazioni di potenziale rischio epidemico transnazionale da patogeni trasmessi da alimenti.

L'impatto delle salmonellosi, così come quello delle altre MTA, risulta sottostimato, per molteplici ragioni:

- la maggior parte dei casi di salmonellosi si manifesta con una forma clinica lieve e, per tale motivo, alcuni soggetti non ricorrono alle cure mediche;
- non sempre i medici richiedono test diagnostici;
- le capacità diagnostiche e i protocolli utilizzati nei vari laboratori non sono uniformi;
- la notifica da parte dei laboratori e gli operatori sanitari è, in generale, fortemente disattesa.

Il risultato è una perdita di casi rilevati a ogni *step* del processo di segnalazione (Figura 5). Per ogni caso notificato, ce ne sono moltissimi che non sono rilevati e che quindi non possono essere inclusi nelle statistiche nazionali, internazionali e mondiali.



Figura 5. Piramide di sorveglianza delle malattie a trasmissione alimentare.

In uno studio condotto sui dati ottenuti dalla sorveglianza basata sulle reti di laboratorio pubblicato nel 2010 da Majowicz et al., è stato stimato che le salmonellosi siano la causa di 93,8 milioni di casi di gastroenterite all'anno (1140 casi per 100 000 abitanti/anno), di cui 80,3 milioni di tipo *foodborne*, e 155 000 decessi [Majowicz SE et al., 2010; Ao TT et al., 2010]. Come si può notare dai dati riportati in Tabella 3, i tassi di incidenza sono molto variabili da Paese a Paese, con un *range* che va da 140 casi per 100 000 abitanti/anno, in Nord Africa e Medio Oriente (EMRO), a 3280 casi per 100 000 abitanti/anno, nella zona che comprende Asia Pacifica, Asia Centrale e Orientale, Australia, Nuova Zelanda e Oceania (WPRO) [Majowicz SE et al., 2010].

Tabella 3. Impatto globale delle salmonellosi nelle 6 strutture organizzative regionali definite dall'Organizzazione Mondiale della Sanità [Majowicz SE, et al., 2010, modificata].

Struttura organizzativa regionale OMS*	Impatto globale delle salmonellosi		
	N° casi	N° decessi	Incidenza per 100 000 abitanti/anno
EMRO	563000	900	140
AFRO	2458000	41000	320
WPRO	53610000	88500	3280
SEARO	29839000	49200	1440
EURO	5065000	8400	690
AMRO	2222000	3700	250

\*EMRO: Mediterraneo Orientale; AFRO: Africa; WPRO: Pacifico Occidentale; SEARO: Sud-Est asiatico; EURO: Europa; AMRO: Americhe

Negli Stati Uniti, l'ultimo report pubblicato dal sistema di sorveglianza *Foodborne Disease Active Surveillance Network (FoodNet)* riferisce, per il 2015, un'incidenza pari a 15,74 per 100 000 abitanti [CDC, 2017]. Per quanto riguarda l'Europa, l'ultimo report pubblicato dall'EFSA in collaborazione con l'ECDC riferisce un'incidenza media di 23,4 casi per 100 000 abitanti, con un'ampia variabilità tra Paese e Paese: l'incidenza più elevata è stata registrata in Repubblica Ceca (126,1 casi per 100 000 abitanti), mentre la Grecia ha riportato il più basso valore di incidenza (3,2 casi per 100 000 abitanti) [EFSA and ECDC, 2016].

I casi di salmonellosi non tifoidee si verificano in soggetti di tutte le classi di età, anche se le manifestazioni cliniche si dimostrano più importanti nei neonati, nei soggetti anziani e nei soggetti immunocompromessi. I fattori di rischio più comunemente associati all'insorgenza della patologia sono l'infezione da HIV, il trattamento cronico con steroidi e la presenza di patologie concomitanti, come patologie renali, epatiche, diabete e anemia falciforme [Gordon MA, 2008].

Di seguito, sono riportati i primi 5 sierotipi isolati da casi umani verificatisi negli Stati Uniti e in Europa:

Stati Uniti [CDC, 2017]		Europa [EFSA and ECDC, 2016]	
Sierotipo	N° dei casi (%)	Sierotipo	N° dei casi (%)
Enteritidis	9150 (19,2)	Enteritidis	31829 (45,7)
Typhimurium	4943 (10,4)	Typhimurium	10997 (15,8)
Newport	4731 (9,9)	1,4,[5],12:i:-	5770 (8,3)
Javiana	2696 (5,6)	Infantis	1585 (2,3)
1,4,[5],12:i:-	2,606 (5,5)	Stanley	763 (1,1)

In Italia, le principali malattie batteriche a trasmissione alimentare sono soggette a notifica obbligatoria in classe II (casi sporadici) e in classe IV (focolai epidemici), ai sensi del Decreto Ministeriale del 15 dicembre 1990. Il flusso informativo che ne deriva è la principale fonte dei dati per il sistema europeo TESSy (*The European Surveillance System*). Accanto a tale flusso, la rete di sorveglianza di laboratorio Enter-Net (*Enteric pathogen Network*) consente la raccolta di informazioni cliniche, epidemiologiche e microbiologiche (sierotipizzazione e caratterizzazione dei ceppi batterici isolati dai casi clinici) utili al completamento dei flussi TESSy previsti per la sorveglianza delle infezioni da *Salmonella*, *Campylobacter*, *Listeria* e STEC.

L'Italia è rappresentata nella rete FWD dall'Istituto Superiore di Sanità (ISS), che coordina un sistema di sorveglianza nazionale, Enter-Net Italia (<http://www.iss.it/ente/>), il quale prevede la registrazione degli isolamenti di patogeni da campioni umani e ambientali. L'ISS funge da *focal point* per l'ECDC, a supporto del Ministero della Salute, per il coordinamento del programma FWD.

Il sistema Enter-Net Italia si pone i seguenti obiettivi:

- ottenere dati descrittivi sugli isolamenti dei patogeni oggetto di studio (*Salmonella*, *Campylobacter*, *Listeria monocytogenes* e altri batteri enteropatogeni), sul territorio italiano in tempi rapidi dal momento della diagnosi;
- descrivere le caratteristiche feno-genotipiche dei ceppi isolati attraverso protocolli standardizzati assicurare la trasmissione dei dati di tipizzazione al flusso TESSy;
- analizzare i dati di sorveglianza in modo da individuare tempestivamente eventuali eventi epidemici sul territorio nazionale (basandosi anche sulla tipizzazione dei ceppi isolati);
- confrontare i risultati della sorveglianza sul territorio italiano con quelli di altri Paesi europei che partecipano alla rete FWD dell'ECDC;
- supportare la ricerca attiva di casi potenzialmente connessi a eventi epidemici transnazionali che possono interessare più di una nazione;
- favorire lo sviluppo e la disseminazione di materiali di riferimento e metodi di caratterizzazione feno-genotipica, armonizzati col settore veterinario al fine di consentire l'integrazione e l'analisi comparativa delle informazioni di sorveglianza.

La distribuzione dei sierotipi nel nostro Paese non rispecchia quella europea: i dati pubblicati nell'ultimo rapporto dell'attività di Enter-Net Italia riferiscono, su un totale di 4914 ceppi isolati, una maggiore frequenza del sierotipo *S. Typhimurium* (40,1%), seguito da *S. Enteritidis* (16,8%), *S. 4,5,12:i:-* (14,1%), *S. Napoli* (3,2%) e *S. Derby* (2,8%) [Dionisi AM et al., 2011].

La febbre tifoide causa ogni anno oltre 20 milioni di casi nel mondo, con una stima di oltre 200 000 decessi [Crump JA et al., 2004; Buckle GC, et al., 2012]. Il subcontinente indiano e il Sud-Est asiatico costituiscono le zone a maggiore incidenza (> 100 casi per 100 000 abitanti ogni anno), ma le infezioni sono molto frequenti anche in America Centro-Meridionale, Africa, Asia, ed Europa Orientale [Crump JA et al., 2004]. Trattandosi di un patogeno a trasmissione fecale-orale, la diffusione di *S. Typhi* è strettamente correlata alle condizioni igienico-sanitarie della popolazione e soprattutto alla disponibilità di acqua potabile. Per questo motivo, l'infezione è rara nei Paesi industrializzati, dove la maggior parte dei casi risulta importata dai Paesi a più alta endemia. Nelle regioni endemiche, l'infezione si verifica soprattutto nelle aree urbane, dove è maggiore il sovraffollamento, e colpisce prevalentemente l'età pediatrica [Gal-Mor O et al., 2014]. Il consumo di alimenti scarsamente controllati lungo la filiera, non correttamente manipolati e conservati ed anche la scarsa igiene personale costituiscono i principali fattori di rischio per lo sviluppo dell'infezione [D'Aoust J and Maurer J, 2007].

Stati Uniti ed Europa sono aree in cui la febbre tifoide è una patologia rara (<10 casi/100 000 abitanti/anno) e si manifesta, principalmente, negli individui che intraprendono viaggi nelle aree endemiche [Crump JA et al., 2004]. I dati più recenti elaborati dai CDC riportano che negli Stati Uniti, nel 2014, si sono verificati 422 casi, il 90% dei quali in soggetti che hanno riferito di aver effettuato viaggi in zone ad elevata endemia [CDC, 2017]. Per quanto riguarda i dati europei, il più recente report pubblicato dall'ECDC riporta 934 casi confermati per l'anno 2014 (0,31 casi per 100 000 abitanti), con il tasso di incidenza più elevato registrato in Francia (0,65 casi per 100 000 abitanti). Analogamente ai casi verificatisi negli Stati Uniti, la maggior parte (85%) dei casi europei si è verificata in seguito a viaggi in aree endemiche per *S. Typhi* [ECDC, 2016].

L'Italia è un Paese a bassa endemia per la febbre tifoide, con un moderato numero di casi all'anno che si verificano principalmente nelle regioni del Sud [Rizzo G et De Vito D, 2003; García-Fernández A et al., 2015]. Gli ultimi dati pubblicati dal Ministero della Salute riferiscono un'incidenza della patologia pari a 0,21 per 100 000 abitanti [Ministero della Salute, Bollettino Epidemiologico].

Negli ultimi anni, per motivi non ancora chiariti, risultano in aumento i casi dovuti *S. Paratyphi A*, in particolare nelle zone sud-orientali dell'Asia, dove il sierotipo è responsabile di circa il 50% di tutti i casi di febbre tifoide [Gal-Mor O et al., 2014; Meltzer e Schwartz, 2010].

### **1.3 Tipizzazione intraspecifica ed epidemiologia molecolare**

Lo scopo principale delle attività di tipizzazione è quello di distinguere stipti geneticamente diversi ma indistinguibili con le tecniche fenotipiche normalmente utilizzate. Poter fare queste distinzioni, è importante nell'ambito dell'analisi epidemiologica dei focolai di infezione e nello studio della popolazione di un patogeno e della sua evoluzione (epidemiologia molecolare). Attualmente, un'indagine epidemiologica senza l'approccio molecolare è da considerarsi incompleta e non in grado di fornire informazioni esaustive per una corretta definizione del quadro epidemiologico. Le tecniche molecolari, infatti, consentono lo studio dell'epidemiologia delle infezioni con un approccio integrato rispetto ai metodi tradizionali, fornendo strategie sempre più accurate di caratterizzazione dei microrganismi patogeni, in grado di stabilire i livelli di clonalità e tracciabilità dei microrganismi isolati. L'identificazione e la tipizzazione dei microrganismi patogeni a livello di specie sono importanti per la diagnosi, la terapia e la sorveglianza epidemiologica delle infezioni [Sabat AJ, et al., 2013; Sammarco ML et al., 2014]. È indispensabile che i metodi di tipizzazione siano basati su *markers* molecolari epidemiologicamente rilevanti e che la velocità dei cambiamenti genetici ai quali i *markers* sono sottoposti sia adatta allo scopo dello studio. Due dei più importanti criteri in epidemiologia molecolare sono il potere discriminante e la concordanza epidemiologica. Il potere

discriminante è la capacità di un metodo di tipizzazione di discriminare due ceppi non correlati tra loro e campionati in modo *random* dalla popolazione di una data specie [Struelens MJ, 1996; van Belkum A et al., 2007]. Un potere discriminante troppo elevato può essere un problema se un metodo di subtipizzazione molecolare discrimina tra i ceppi che fanno parte dello stesso *outbreak*. La concordanza epidemiologica è la probabilità che ceppi epidemiologicamente correlati siano abbastanza simili attraverso l'epidemiologia molecolare da essere classificati all'interno dello stesso clone [Struelens MJ, 1996]. In altre parole, al fine di essere certi nelle conclusioni riguardo alla causa di una epidemia, risulta indispensabile che i dati derivanti dall'epidemiologia convenzionale e quelli della epidemiologia molecolare siano concordi tra loro, in modo da avere un'elevata concordanza epidemiologica. Al fine di massimizzare la concordanza epidemiologica è necessario selezionare i geni specifici (*markers*) che sono responsabili di eventi epidemici e quindi che posseggano una rilevanza epidemiologica.

La tipizzazione molecolare dei casi di salmonellosi può essere effettuata attraverso l'utilizzo di vari metodi molecolari che differiscono fra loro per il meccanismo di funzionamento e vengono suddivisi in metodi basati su: a) restrizione enzimatica, b) amplificazione genica, c) sequenziamento [Sabat AJ, 2013; Sammarco ML et al., 2014; Wattiau P et al., 2011].

### **1.3.1 Metodi basati sulla restrizione enzimatica**

Tra le tecniche di tipizzazione molecolare basate su digestione enzimatica del DNA, le più note sono l'analisi del polimorfismo della lunghezza dei frammenti di restrizione (*Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP*), la ribotipizzazione e l'elettroforesi su gel in campo pulsato (*Pulsed-field Gel Electrophoresis, PFGE*).

La tecnica RFLP è una tecnica basata sull'analisi dei polimorfismi dei frammenti di restrizione dei geni codificanti per gli RNA ribosomiali. È una tecnica molto laboriosa, soprattutto nel protocollo che prevede il *Southern blotting*, richiede tempi lunghi, una grande manualità da parte degli operatori e, inoltre, una grande quantità di DNA campione. Questi fattori limitanti spesso poco si conciliano con l'esigenza di tempestività di una indagine finalizzata al controllo di un'epidemia.

La ribotipizzazione è stata una delle prime metodiche di genotipizzazione batterica utilizzate, nella sua versione classica manuale. Consente di valutare polimorfismi di restrizione nell'ambito e nell'intorno degli operoni ribosomiali nei genomi in esame (nei genomi batterici è presente più di un operone dei geni codificanti per gli RNA ribosomiali). Il DNA genomico viene digerito con enzimi di restrizione e i profili ottenuti vengono sottoposti alla *Southern blot*, ovvero vengono ibridati con sonde che riconoscono i geni degli RNA ribosomiali. La classificazione dei ceppi avviene quindi sulla

base del *ribopattern* ottenuto. Il sistema ha un buon potere differenziale, un'ottima riproducibilità e una discreta generalità di impiego, ma è lungo e laborioso da impiegare. Per ovviare agli inconvenienti, da alcuni anni viene commercializzata una variante automatizzata, ma il costo dell'apparecchiatura è molto elevato.

La PFGE è considerata il *gold standard* per la caratterizzazione molecolare di numerosi microrganismi patogeni a trasmissione alimentare. L'intero genoma viene digerito con un enzima di restrizione scelto in modo da effettuare pochi tagli nel genoma batterico in esame, in modo da ottenere circa 8-15 frammenti di grandi dimensioni, tanto da non poter essere separati in sistemi elettroforetici tradizionali, per cui si ricorre al campo pulsato. Il risultato è un profilo di bande che può variare da ceppo a ceppo per numero di bande e peso molecolare delle stesse, in funzione della collocazione nel genoma dei siti di restrizione dell'enzima utilizzato. I vantaggi della PFGE sono considerevoli, essendo questa una tecnica molto discriminante in grado di rilevare modificazioni genetiche dovute a mutazioni, inserzioni, delezioni e trasposizioni. Questa metodica presenta, tuttavia, notevoli svantaggi: è laboriosa, richiede tempi di esecuzione mediamente lunghi (circa 72 ore complessive di analisi) e richiede, inoltre, anche una certa perizia tecnica ed esperienza da parte dell'operatore.

### **1.3.2 Metodi basati sull'amplificazione genica**

La tecnica più nota è l'amplificazione casuale di DNA polimorfico (*Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD*), basata sull'uso della PCR con la quale, utilizzando corti *primers* non specifici e condizioni di reazione a bassa stringenza, si amplificano numerosi tratti del genoma posto in reazione. I tratti di genoma amplificati risultano in altrettante bande elettroforetiche. Il sistema basa la propria capacità discriminante sulla sensibilità di questa PCR non specifica al variare delle condizioni di reazione. Tuttavia, se questo da un lato conferisce elevato potere differenziale, dall'altro rende il sistema instabile e quindi poco riproducibile, pertanto la metodica è realmente valida solo se gli stipti da analizzare sono posti in reazione in parallelo nella stessa seduta. Questo è l'unico svantaggio, ma molto rilevante, di questa metodica, che presenta molteplici vantaggi: la semplicità, l'economicità, il buon potere differenziale, la rapidità e la generalità di impiego. Alla luce dei suoi limiti e dei suoi vantaggi, la RAPD resta valida nell'uso mirato in analisi di focolai.

### **1.3.3 Metodi basati sul sequenziamento**

Il sequenziamento è una tecnica molecolare molto utile per lo studio dei polimorfismi nelle sequenze geniche che presentano sequenze variabili e conservate. Il vantaggio più significativo della

genotipizzazione mediante sequenziamento, rispetto ai metodi basati sull'analisi di profili di bande, è l'elevata riproducibilità, poiché si basa su sequenze ben definite che possono essere conservate in database online e confrontati con altri laboratori.

Il *Multiple Locus Variable Number of Tandem Repeat Analysis* (MLVA) è una tecnica di tipizzazione basata sul sequenziamento che si basa sullo studio della variabilità del numero di sequenze *tandem* in specifici loci del genoma batterico. È una metodica relativamente semplice, con costi di esecuzione contenuti e dotata di un buon potere discriminatorio. Inoltre, è facilmente standardizzabile e riproducibile tra laboratori, garantendo la possibilità di confrontare gli isolati con un sistema univoco di interpretazione.

Il *Multi-Locus Sequence Typing* (MLST) è stato uno dei primi metodi di tipizzazione basati sul sequenziamento, sviluppato nel 1998 per *Neisseria meningitidis* e, da allora, diventato uno dei metodi molecolari più utilizzati per le indagini epidemiologiche e gli studi sull'evoluzione molecolare di molti microrganismi patogeni. Questa metodica ha offerto un nuovo approccio all'epidemiologia molecolare, essendo in grado di identificare e tracciare la diffusione globale dei ceppi microbici mediante l'uso di Internet. Il MLST consiste essenzialmente nella acquisizione delle sequenze nucleotidiche di circa 500 paia di basi di un certo numero (una decina) di geni *housekeeping* (geni che codificano per funzioni basilari del metabolismo cellulare, quindi sempre espressi). Mediante l'analisi delle sequenze, si identifica il tipo di allele presente in ognuno dei loci considerati per ciascuno stipite analizzato. Ne deriva che il genotipo di ciascuno stipite viene codificato con una serie numerica in cui ogni numero corrisponde al tipo di allele presente per ognuno dei loci considerati. Il sistema prevede, quindi, la codifica numerica di ogni allele esistente e la costituzione di banche dati rispetto alle quali effettuare l'identificazione dei tipi allelici e dei genotipi. Un grosso vantaggio dell'MLST è il tipo di dato, che non è un tracciato elettroforetico ma un dato di sequenza, quindi perfettamente trattabile informaticamente. Grazie alla buona riproducibilità e trasferibilità dei dati di questa tecnica, è stato possibile sviluppare, a livello mondiale, delle banche dati, facilmente accessibili a tutti, che permettono l'identificazione dei tipi allelici e dei genotipi degli isolati testati.

#### **1.3.4 Whole-Genome Sequencing**

Il sequenziamento dell'intero genoma (*Whole-Genome Sequencing*, WGS) permette di accedere a un elevato numero di informazioni sugli isolati batterici e risulta essere applicabile in modo flessibile alla sorveglianza delle malattie trasmesse da alimenti, all'ispezione degli alimenti, alle indagini dei focolai e agli studi di attribuzione della loro origine. I dati ricavati possono essere utilizzati per più

scopi simultaneamente: identificazione di specie, *subtyping*, ricerca di marcatori di virulenza e antibiotico resistenza [Sammarco ML et al., 2014]. I dati possono essere inoltre rianalizzati in qualsiasi momento, e questo può essere utile per la gestione di patogeni emergenti nel tempo. In letteratura sono presenti numerosi studi che documentano l'elevato potere discriminante del WGS, in confronto alle convenzionali tecniche di *subtyping*, nel rilevare variazioni genomiche [Scaltriti E et al., 2015; Gardy JL et al., 2011]. Il primo strumento di sequenziamento ad alta velocità (*Next Generation Sequencing*, NGS) è stata la piattaforma 454 FLX *pyrosequencing* (<http://www.454.com>), sviluppata da 454 Life Sciences, poi comprata da Roche e resa disponibile nel 2005. Nel 2007, Illumina (<http://www.illumina.com>) ha lanciato sul mercato la piattaforma Genome Analyzer sviluppato da Solexa GA, e più recentemente, SOLiD è stato rilasciato da Applied Biosystems (<http://www.appliedbiosystems.com>). Questo campo è in rapida espansione e nuove piattaforme sono in costante sviluppo e vengono continuamente lanciate sul mercato, come ad esempio la piattaforma HeliScope, sviluppata da Helicos (<http://www.helicosbio.com>), Ion Torrent PGM ideata dalla Life Technologies (<http://www.iontorrent.com/>) e la piattaforma di sequenziamento sviluppata da Pacific Biosciences (<http://www.pacificbiosciences.com>). Questi metodi NGS hanno una diversa biochimica di base e si differenziano per il protocollo di sequenziamento e per la produzione di numero di sequenze e lunghezza: il SOLiD può essere più adatto per applicazioni che richiedono un alto rendimento di quantità di sequenze, ma non per analisi che richiedono il sequenziamento di sequenze con un elevato numero di basi nucleotidiche, come ad esempio i progetti di sequenziamento di un genoma completo, mentre sia il 454 che l'Illumina forniscono dati idonei per analisi di metagenomica [Sabat AJ et al., 2013; Sammarco ML, 2014].

### **1.3.5 Analisi filogenetiche**

Per analizzare e confrontare i dati di sequenza si ricorre ai metodi filogenetici, particolarmente utili per descrivere l'epidemiologia molecolare, le modalità di trasmissione e l'evoluzione di numerosi microrganismi. I recenti progressi nei metodi filogenetici e nei software per l'inferenza della filogenesi permettono di ottenere informazioni sempre più approfondite sulle dinamiche dell'emergenza delle epidemie apportando un contributo fondamentale allo studio epidemiologico. Altra importante applicazione dei metodi filogenetici riguarda lo studio delle modalità di diffusione ed evoluzione dei microrganismi in una specifica popolazione (filodinamica) e/o in un'area geografica definita (filogeografia) [Grenfell BT et al., 2004; Lemey P, 2009]. Queste informazioni sequenza-derivate sono riassunte negli alberi filogenetici, che rappresentano un valido strumento

per la definizione ed il miglioramento degli interventi strategici per il controllo delle malattie infettive in territori definiti in ambito di sanità pubblica.

Il concetto di filodinamica è stato introdotto per la prima volta da Grenfell nel 2004, e descrive come la notevole varietà dei processi evolutivi filogenetici dei patogeni sia influenzata dalla concomitanza di fattori quali la risposta immunitaria dell'ospite, che esercita una pressione selettiva sul patogeno, fenomeni di deriva genica "a collo di bottiglia" e dinamiche epidemiche di popolazione inter-ospite [Grenfell BT et al., 2004]. L'analisi filodinamica comunemente utilizza un modello temporale, definito orologio molecolare (*molecular clock*), che si basa sull'assunto che le mutazioni si accumulino nel tempo in modo pressoché costante. Tale modello consente di delineare le relazioni intercorrenti tra le distanze genetiche e il tempo, permettendo, al tempo stesso, di datare gli eventi di divergenza evolutiva. I modelli più semplici prevedono un orologio molecolare più rigido (*strict clock model*), nel quale si assume che tutti i *lineage* evolvano alla stessa velocità. Diversamente, nei modelli più complessi (*relaxed clock model*) le velocità evolutive variano nel tempo e tra i vari *lineage*, fornendo degli intervalli di variabilità intorno ad un valore medio della velocità evolutiva. L'utilizzo di modelli di un orologio molecolare per stimare i tassi evolutivi e i tempi di divergenza di sequenze eterocrone (sequenze campionate in intervalli di tempo relativamente lunghi) hanno recentemente reso possibile lo sviluppo di metodi basati sulla coalescenza, per studiare le dinamiche delle popolazioni batteriche a livello intra- e inter-ospite su scala temporale. La teoria della coalescenza si basa sulla correlazione tra il tempo in cui due taxa o due *lineage* hanno condiviso uno stesso ancestore e le dimensioni della popolazione in esame, rappresentando così un ottimo strumento per valutare le modificazioni di una popolazione virale nel tempo. Le dinamiche demografiche e di migrazione della popolazione umana svolgono, inoltre, un ruolo importante nel determinare la forma della struttura filogenetica dei microrganismi, per cui la filogeografia rappresenta una parte cruciale della caratterizzazione filodinamica di un'infezione. L'approccio filogeografico si basa sull'esistenza di una relazione tra evoluzione molecolare di un organismo e la sua distribuzione spaziale.

La combinazione di analisi genetiche e geografiche rivelano non solo il luogo di origine delle infezioni, ma anche la modalità di trasmissione e il tasso di diffusione spazio-temporale.

Recentemente, è stata proposta una classificazione dei sierotipi di *Salmonella enterica* in due *clade*, A e B, basata sull'analisi filogenetica di 93 loci del *core*-genoma [den Bakker HC, 2011] (Figura 6).

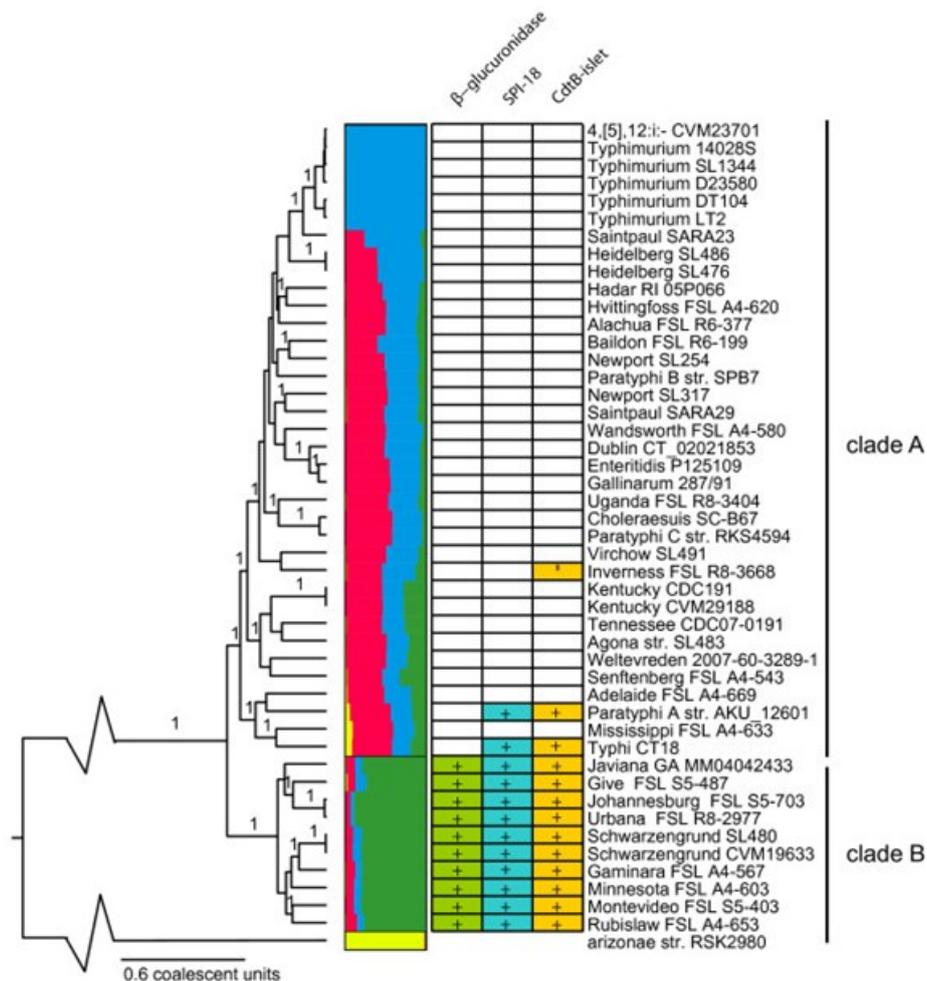


Figura 6. Suddivisione di *Salmonella enterica* in *clade* [den Bakker HC et al., 2011].

Il *clade A* può essere ulteriormente suddiviso in 3 *subclade*: il *subclade* Typhi, a cui appartengono i sierotipi Typhi, Paratyphi A, Mississippi e Adelaide, il *subclade* Agona e un terzo *subclade* contenente i restanti sierotipi del *clade A* [den Bakker HC, 2011]. I sierotipi appartenenti al *clade A* sono tutti caratterizzati dall'assenza dell'operone  $\beta$ -glucuronidasi, che determina la capacità di un sierotipo di adattarsi all'ambiente intestinale. I sierotipi del *subclade* Typhi sono caratterizzati dalla presenza dell'isola di patogenicità SPI-18 e del gene *cdtB*. SPI18 è un frammento di DNA di 2,3 kb codificante per due proteine, una importante per l'invasione delle cellule epiteliali, mentre l'altra agevola la fagocitosi del batterio da parte dei macrofagi. *cdtB* è una delle subunità che costituiscono la tossina *Cytolethal Distending toxin* (CDT), fondamentale per l'ingresso di *Salmonella* nelle cellule epiteliali della mucosa intestinale. La presenza di SPI-18 e *cdtB* è tipica anche dei sierotipi del *clade B*, nel cui genoma è però presente l'operone  $\beta$ -glucuronidasi [den Bakker HC, 2011].

Gli studi di evoluzione molecolare sono uno strumento indispensabile per l'interpretazione dei processi alla base dell'evoluzione della materia vivente e forniscono uno strumento utile per lo studio degli organismi. Questo tipo di analisi può fornire una serie di informazioni di grande aiuto

alla comprensione del ruolo e della funzione di un gene o del suo prodotto. È proprio questo uno degli obiettivi più importanti degli studi di evoluzione molecolare. Va sottolineato, tuttavia, che gli studi condotti finora dimostrano chiaramente che i meccanismi molecolari alla base dei processi evolutivi sono ancora in gran parte sconosciuti. L'interpretazione dei risultati richiede, quindi, molta cautela.

#### **1.4 *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sierotipo Napoli**

*Salmonella enterica* subsp. *enterica* sierotipo Napoli (*S. Napoli*) è stata isolata per la prima volta nel 1945, a Napoli, da un portatore addetto a una mensa militare americana [Bruner DW et Edwards PR, 1945]. Tale sierotipo è definito dalla formula antigenica 1,9,12:l,z13:e,n,x e appartiene allo stesso sierogruppo (O:9, in passato denominato gruppo D1) a cui appartengono *S. Typhi* e alcuni sierotipi non tifoidei importanti in ambito epidemiologico quali agenti di malattia nell'uomo e/o nell'animale; in particolare, si possono ricordare *S. Enteritidis*, *S. Dublin* e *S. Gallinarum* [Le Minor L e Popoff M Y, 1987].

*S. Napoli* è in grado di infettare e causare malattia in un'ampia gamma di specie ospiti, compresi gli esseri umani [Huehn S et al., 2010].

Per quanto riguarda le classi di età, nello studio caso-controllo condotto da Oggioni e colleghi, nel 2010, viene riferita una differenza statisticamente significativa tra i casi di *S. Napoli* e i controlli (affetti da *S. non Napoli*): nei controlli, la fascia di età 1-5 anni risulta la più colpita (48,9%), mentre nei casi le fasce maggiormente colpite sono 6-15 anni (31,4%) e > 60 anni (21,4%) [Oggioni C et al., 2010]. Un lavoro pubblicato da Graziani e colleghi, nel 2015, riporta che il 51,5% dei casi di *S. Napoli* riguarda i bambini di età compresa tra 0 e 5 anni, mentre la seconda classe di età più colpita risulta quella costituita da soggetti con oltre 65 anni (17,3%). Comparando la distribuzione per classi di età tra i casi di *S. Napoli* e i casi di *S. non Napoli*, anche quest'ultimo studio evidenzia una differenza significativa, con una proporzione di casi di *S. Napoli* significativamente più elevata nei bambini al di sotto di 1 anno di età, nella fascia di età compresa tra 1 e 5 anni e nei soggetti > 65 [Graziani C. et al., 2015].

La sintomatologia è generalmente quella gastroenterica tipica delle salmonellosi non tifoidee, ma il quadro clinico può assumere, in alcuni casi, caratteristiche simil-tifoidee, con febbre elevata, e comportare un elevato tasso di ospedalizzazione (33,0-57,0%), superiore a quello medio riferito in letteratura per le salmonellosi non tifoidee (22,0-29,6%) [Pontello M et al., 1984; Oggioni C et al., 2010; Graziani C et al., 2015].

Dalla letteratura è noto che una bassa carica infettante ( $10^2$  UFC/mg) è sufficiente per determinare forme clinicamente invasive [Gill ON et al., 1983; Pontello M et al., 1984].

Le basi genetiche della virulenza di *S. Napoli*, ancora poco studiate, hanno documentato l'assenza del gene plasmidico *spvC*, tipico di molti dei sierotipi non-tifoidei come *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis*, la cui funzione è quella di favorire la sopravvivenza del batterio all'interno dei macrofagi durante il processo patogenetico [Graziani C et al., 2011; Huehn S et al., 2010].

Le infezioni umane causate da *S. Napoli* sono relativamente rare in Europa. Secondo quanto riportato da Fisher e colleghi, nel periodo 2000-2006, sulla base dei dati ricavati dal *database* dell'Enter-Net, il numero di casi di infezione dovuti a *S. Napoli* è aumentato del 140,2%, passando da 122 casi (0,10% sul totale delle salmonellosi) nel 2000 a 293 casi (0,36%) nel 2006, quando tale sierotipo risultava essere al 22° posto, in ordine di frequenza, tra i sierotipi non tifoidei [Fisher IS et al., 2009]. L'aspetto più interessante è dato dalla disomogenea distribuzione dei casi all'interno dei Paesi europei, con una significativa concentrazione di oltre l'87% dei casi in tre soli Paesi dell'EU/EEA: Francia, Italia e Svizzera (Figura 7). In Francia, nel periodo analizzato da Fisher e colleghi, l'infezione ha colpito con maggiore frequenza le regioni della costa occidentale (Aquitania, Paesi della Loira e Poitou-Charentes) ma, nel corso degli anni, ha iniziato ad espandersi anche verso le regioni più interne. Diversamente, in Svizzera si osserva una maggiore dispersione dei casi di infezione da *S. Napoli*, tuttavia, la regione dove si registra la maggior frequenza di casi è il Canton Ticino. In Italia, i punti focali dell'infezione sono due: le regioni settentrionali confinanti con la Svizzera (Lombardia e Piemonte) e l'Umbria [Fisher IS et al., 2009]. Tali aree sono da considerare come punti focali ben distinti in quanto non sono confinanti tra loro e non presentano alcun link epidemiologico che li possa associare. Inoltre, il *virulotyping* (identificazione dei geni di virulenza) e la tipizzazione molecolare, eseguita tramite PFGE, sui campioni di *S. Napoli* isolati in tali regioni, mostrano profili molecolari estremamente eterogenei ma che correlano tra loro in funzione dell'area geografica di origine, differenziando, dunque, i casi isolati nel Settentrione da quelli del Centro-Italia [Fisher IS et al., 2009; Graziani C et al., 2011]. Questo aspetto rafforza ancor di più l'ipotesi della presenza di due punti focali distinti all'interno del territorio italiano.

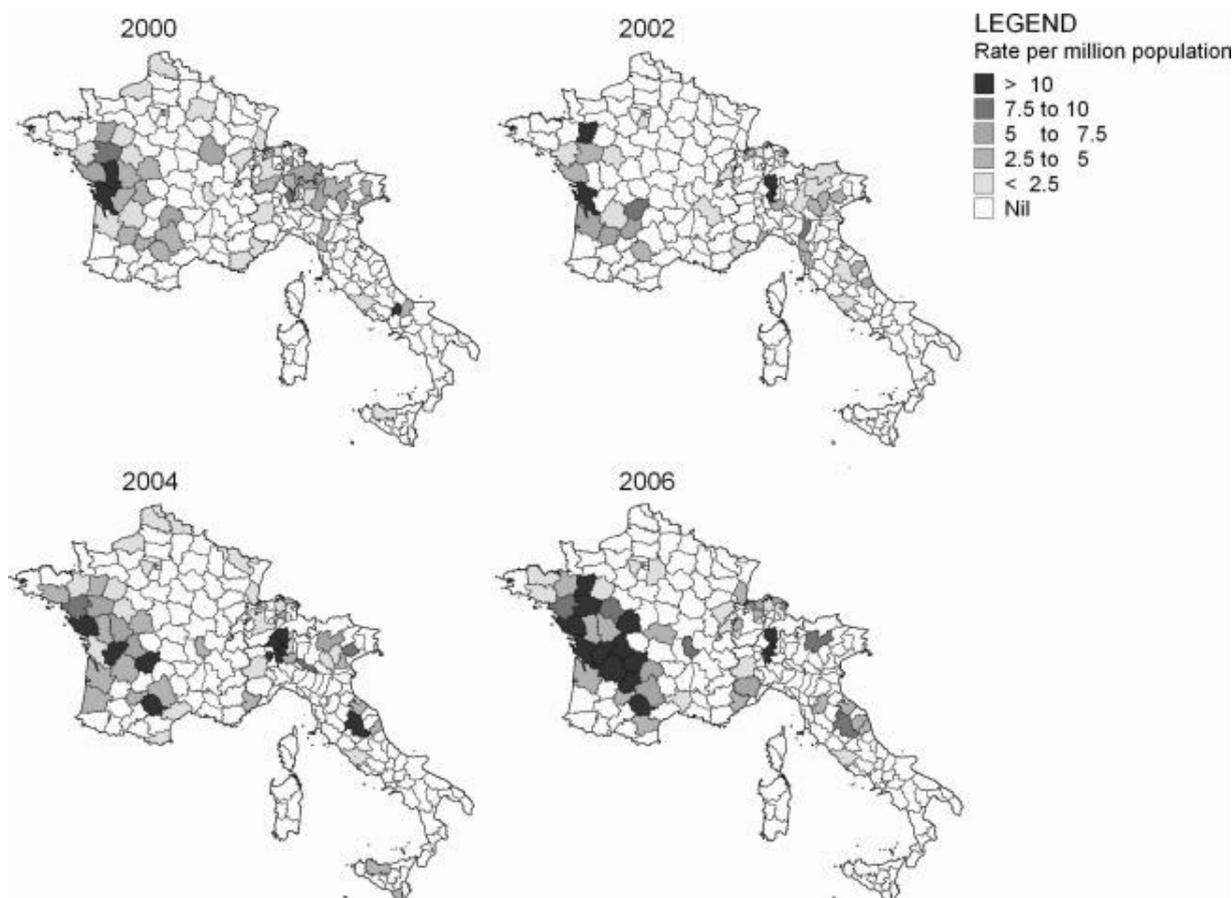


Figura 7. Distribuzione e evoluzione dei casi di S. Napoli in Francia, Svizzera e Italia (2000-2006) [Fisher IS et al., 2009].

Secondo l'ultimo rapporto ECDC/EFSA, nel 2014 sono stati riportati 366 casi confermati di S. Napoli su un totale di 69 663 casi di salmonellosi non tifoidee (0,53%) e, in ordine di frequenza, il sierotipo si è posizionato al 13° posto [EFSA and ECDC, 2015].

In Italia, l'analisi condotta da Graziani e colleghi su quasi 230 000 casi di salmonellosi non tifoidee raccolti dal 1980 al 2011 dal Network Enter-Net Italia, ha documentato un incremento significativo (+28,2%) della frequenza dei casi di infezione dovuti al sierotipo Napoli, sempre compreso tra i 6 sierotipi più frequentemente isolati [Graziani C et al., 2013].

Nel periodo 2000-2013, in Italia, sono stati osservati 1527 casi dovuti a S. Napoli, pari al 2,3% dei casi di salmonellosi umane), e i casi sono risultati maggiormente concentrati nelle regioni settentrionali confinanti con la Svizzera, Piemonte e Lombardia e, in particolare, in quest'ultima regione le aree maggiormente interessate sono quelle caratterizzate dalla presenza di laghi (province di Varese, Como e Lecco) (Figura 8) [Graziani C et al., 2015].

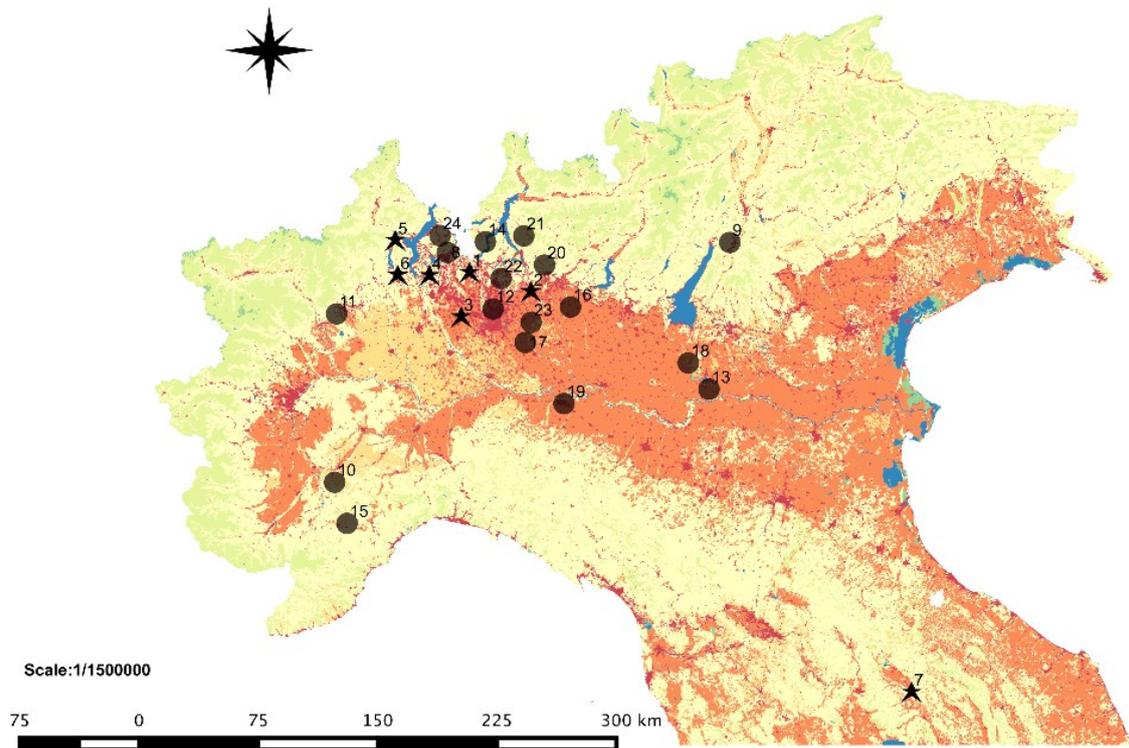


Figura 8. La distribuzione dei casi di infezione da *S. Napoli* nel Nord Italia [Graziani C et al., 2015].

Le infezioni causate da *S. Napoli* mostrano una marcata stagionalità, con una maggiore frequenza di casi nel periodo estivo, senza che, tuttavia, siano identificabili eventi epidemici riconducibili alla stessa fonte e veicolo di contagio. In Francia, nel periodo analizzato da Fisher e colleghi, l'87% degli stipiti di *S. Napoli* è stato isolato tra i mesi di giugno e ottobre. Anche in Italia e in Svizzera si rileva una maggiore frequenza di isolamento di questo batterio in estate, con un numero di casi notificati che cresce rapidamente tra i mesi di maggio e giugno, mostra un caratteristico picco nel mese di luglio, che si ripresenta a settembre, con un elevato numero di isolamenti, per poi decrescere altrettanto rapidamente in ottobre [Fisher IS et al., 2009; Graziani C et al., 2013].

Pochissime sono le epidemie causate da *S. Napoli* e riferite in letteratura. Tutti i casi registrati nei 7 anni analizzati da Fisher e colleghi risultano essere sporadici, ad eccezione di un piccolo *foodborne outbreak* familiare identificato in Francia, associato al consumo di uova contaminate. Indagini più approfondite portarono all'isolamento di *S. Napoli* in animali avicoli allevati nelle regioni occidentali della Francia ed identificarono tali animali da allevamento come sorgente certa di questo piccolo focolaio epidemico. Si esclude, tuttavia, una loro implicazione nell'incremento del numero dei casi di infezione, in quanto, la distribuzione di tali prodotti avicoli a livello nazionale, avrebbe determinato una maggiore diffusione di *S. Napoli* sul territorio con una percentuale di incremento superiore di molto a quella osservata [Fisher IS et al., 2009].

L'incremento dei casi di *S. Napoli* non sembra essere associato ad un evento epidemico ma, in realtà, anno dopo anno, mostra sempre più tutte le caratteristiche di un'iperendemia, ossia una forma morbosa costantemente presente in una popolazione o in una determinata area geografica con un'alta prevalenza [Oggioni C et al., 2010].

La più nota epidemia causata da *S. Napoli* è quella che colpì Inghilterra e Galles nel 1982 [Gill O.N. et al., 1983; Roberts J.A. et al., 1989]. L'indagine epidemiologica svolta dal *Communicable Disease Surveillance Centre* (CDSC) del *Public Health Laboratory Service* britannico ha riconosciuto l'insorgenza di un focolaio epidemico nel periodo compreso tra maggio e agosto [Gill ON et al., 1983]. Nell'evento sono stati coinvolti 245 soggetti, i quali, nella maggioranza dei casi, hanno manifestato sintomi gastroenterici (diarrea, febbre e vomito). Tuttavia, con una frequenza maggiore di quella usualmente riferita in letteratura (12% vs 5% dei casi) l'infezione è risultata invasiva e responsabile di complicazioni cliniche, quali batteriemie, peritonite, coma diabetico ed artrite settica [Gizzarelli S et al., 1983; Gill ON et al, 1983]. L'inchiesta epidemiologica ha permesso l'identificazione del veicolo dell'infezione, del tutto inusuale: un tipo di merendine farcite da crema al cioccolato prodotte in Italia e contaminate da *S. Napoli* [Gill ON et al., 1983]. Una delle anomalie osservate in occasione di tale *outbreak* ha riguardato la tipologia dell'alimento implicato, caratterizzato da un basso contenuto di umidità ( $a_w$  0,35-0,50), che non lo rende favorevole per la proliferazione microbica di *Salmonella*, per la quale sono necessari valori di  $a_w$  non inferiori a 0,95 [Greenwood MH and Hooper WL, 1983]. Tuttavia, se si verifica una contaminazione in questa tipologia di alimento, l'agente patogeno, pur non potendo moltiplicarsi, risulta in grado di sopravvivere per un periodo di tempo estremamente prolungato e di resistere maggiormente ai trattamenti termici, grazie all'azione protettiva svolta dai lipidi contenuti in tale matrice alimentare. Infatti, l'alto contenuto in sostanze lipidiche conferisce all'agente contaminante una maggior resistenza nei confronti dell'acidità gastrica, consentendo al patogeno di colonizzare il tratto intestinale e dare luogo alla manifestazione clinica [Gibson B, 1973; Komitopoulou E and Peñaloza W, 2009]. La carica batterica riscontrata nelle merendine, era estremamente bassa (1,6 UFC/g per 16 g di alimento), se confrontata con la dose infettante normalmente associata alle infezioni da *Salmonella* [Blaser MJ and Newman LS, 1982].

Altre epidemie correlate al consumo di alimenti contaminati da *S. Napoli* sono state segnalate in provincia di Brescia, in seguito al consumo di carne di cavallo [Costa E et al., 1987] ed anche in altri Paesi, in particolare in Francia, in seguito al consumo di maionese [Fisher IS et al., 2009] e in Slovenia e Danimarca, tra il 2008 e il 2009, in seguito al consumo di rucola prodotta in Italia [Andersson Y.,

2004]. A questi ultimi episodi si collegano alcune allerte del sistema europeo RASFF che, nei periodi 2004-2005 e 2008-2009, ha segnalato la contaminazione da *S. Napoli* di campioni di vegetali (in particolare rucola) prodotti in Campania, nella valle del Sele [Capuano F et al., 2011]. Nel 2011, inoltre, si è verificata un'epidemia connessa al consumo di acqua contaminata in una scuola elementare in provincia di Udine [Zuliani M et al., 2012].

Progressivamente, come osservato da Graziani e colleghi [Graziani C et al., 2015], in Italia le aree interessate da casi di infezione da *S. Napoli* sono drasticamente aumentate tra il 2000 e il 2013: nel 2000 i casi sono stati riportati da 18 comuni nel nord e nel centro del Paese, mentre nel 2013 il numero di comuni in cui sono stati rilevati casi è salito a 128, in tutto il Paese.

La peculiare distribuzione dei casi, per la gran parte circoscritti ad alcune aree geografiche di un limitato numero di Paesi europei e la rarità degli eventi epidemici, quasi esclusivamente riferibili all'Italia, spiegano le scarse conoscenze oggi disponibili sull'habitat naturale di *S. Napoli* e sulle catene di contagio di tale sierotipo. Fino ad oggi, le informazioni disponibili sono circoscritte al nostro Paese e documentano l'isolamento di *S. Napoli* da diverse specie animali: lucertole [Carmeni A et al., 1968], cinghiali [Chiari M et al., 2013], uccelli [Mancini L et al., 2014], volpi [Chiari M et al., 2014] e, più recentemente, cani [Dotto G et al., 2017]. Rispetto alle modalità di contagio per l'uomo, lo studio di Oggioni e colleghi ha evidenziato che l'esposizione al contatto, anche per attività ludiche, con acque superficiali, rappresenta il più significativo fattore di rischio (OR aggiustato = 3,82; IC 95% = 1,03-14,19) [Oggioni C et al., 2010]. Da queste informazioni disponibili, è stato ipotizzato che nell'ambiente esista un serbatoio animale, non ancora individuato (rappresentato, ad esempio, animali selvatici o uccelli migratori), responsabile della contaminazione dei corpi idrici superficiali, mentre il veicolo alimentare sarebbe meno rilevante [Oggioni C et al., 2010; Graziani C et al., 2011, Chiari M et al., 2013, Mancini L et al., 2014]. Tale ipotesi è suggerita dalla somiglianza degli isolati evidenziata dallo studio di Fisher et al., 2009, che, pur provenendo da fonti differenti, correlano tra loro dal punto di vista molecolare in funzione della località di isolamento [Fisher IS et al., 2009]. Si osserva, dunque, una circolazione locale dei diversi cloni, i quali risultano in grado di persistere nello stesso ambiente anche per anni [Graziani C et al., 2011]. Allo scopo di valutare la presenza di *Salmonella* a livello ambientale, uno studio dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna (IZSLER) ha effettuato un'indagine a livello della fauna selvatica del Nord Italia, in particolare a livello dei cinghiali cacciati in tre differenti stagioni di caccia [Chiari M et al., 2013]. I cinghiali, essendo distribuiti in ampi territori ed essendo onnivori, risulterebbero essere dei buoni indicatori della presenza di *Salmonella* ed altri batteri nell'ambiente [Chiari M et

al., 2013]. A causa dell'ampia varietà della loro alimentazione, che include anche rettili e insetti, infatti, i cinghiali possono ingerire batteri che colonizzano il loro tratto intestinale rendendoli veicoli di infezione. La sierotipizzazione eseguita sugli stipiti isolati da tali cinghiali ha mostrato la presenza di *S. Napoli*, confermando dunque l'esistenza di questo patogeno a livello ambientale [Chiari M et al., 2013]. L'isolamento di *S. Napoli* da un usignolo di fiume nel Centro Italia ha suggerito l'esistenza di un'associazione di questo sierotipo con le acque superficiali [Mancini L et al., 2014], ipotesi suggerita anche dalle numerose osservazioni emerse da uno studio caso-controllo condotto in Lombardia [Oggioni C et al., 2010]. Tale studio ha identificato come potenziali fattori di rischio l'esposizione alle acque superficiali e le attività svolte in prossimità di tali acque, ciascuno con un *odd ratio* superiore a 3, valore che indica una più che moderata associazione di tali fattori con l'insorgenza della patologia [Oggioni C et al., 2010]. Inoltre, l'elevata frequenza di isolamento nei bambini, congiuntamente alla maggior identificazione di questo sierotipo nei mesi estivi in cui le attività ludiche all'aperto sono più frequenti, rafforzano la teoria di un *reservoir* ambientale in grado di contagiare l'uomo [Oggioni C et al., 2010]. Tenendo presente tutti questi elementi, l'ipotesi è che esista un serbatoio animale (uccelli acquatici, pesci d'acqua dolce o altri animali selvatici) responsabile della contaminazione delle acque superficiali, eventualmente anche con periodicità stagionale (uccelli migratori, animali che vanno in letargo nei mesi freddi) e che le acque contaminate rappresentino poi il veicolo di contagio o per diretta esposizione (attività natatorie) o, nel caso le acque vengano usate per l'irrigazione, attraverso la contaminazione di alimenti [Oggioni C et al., 2010; Chiari M et al., 2013; Mancini L. et al., 2014; Gill ON et al., 1983; Andersson Y 2004; Costa E et al., 1987]. Sfortunatamente, non è stato ancora identificato con certezza uno specifico serbatoio, da cui tale infezione è in grado di diffondere e contagiare animali ed esseri umani.

## 2. SCOPO

Lo scopo di questo lavoro di tesi è stato quello di tracciare un profilo epidemiologico e molecolare e condurre un'analisi evolutiva del sierotipo Napoli che, in base alla letteratura, risulta circoscritto ad alcune aree geografiche europee e, a più riprese, dal 1982, "riemergente" in Regione Lombardia.

Tale lavoro è stato condotto presso il Laboratorio Enterobatteri del Dipartimento di Scienze della Salute dell'Università degli Studi di Milano, il quale, come previsto dalla Delibera della Giunta Regionale n° X/5954 del 5 dicembre 2016, svolge la funzione di centro di riferimento regionale per la sorveglianza dei patogeni enterici, con il compito di elaborare i dati forniti dai laboratori facenti parte della rete Enter-Net Italia e di caratterizzare molecularmente gli stipiti batterici.

Dal 2016, il Laboratorio Enterobatteri è parte del Centro di Ricerca Coordinato (CRC) "Epidemiologia e Sorveglianza Molecolare delle Infezioni (EpiSoMI)", che promuove attività scientifiche di base e applicate nei settori della sorveglianza e prevenzione delle infezioni e delle malattie infettive attraverso la sorveglianza epidemiologica, l'epidemiologia molecolare, la genomica e la bioinformatica.

Gli obiettivi specifici di questo lavoro di tesi sono stati:

1. Tracciare un profilo epidemiologico dei casi umani di *S. Napoli* verificatisi in Lombardia nel periodo 2010-2016, attraverso l'analisi e l'elaborazione dei dati ottenuti dal sistema di sorveglianza di laboratorio Enter-Net Italia (<http://www.iss.it/ente>);
2. Caratterizzare mediante elettroforesi su gel a campo pulsato, tecnica considerata il *gold standard* mondiale per la sorveglianza molecolare dei patogeni a trasmissione alimentare in sanità pubblica, gli stipiti provenienti da casi umani di *S. Napoli* pervenuti al Laboratorio Enterobatteri nel periodo 2010-2016, al fine di individuare i "tipi" prevalenti ed evidenziare eventuali *cluster* epidemici, così da poter contribuire al riconoscimento della catena di contagio e del veicolo d'infezione;
3. Mettere a punto il *Multi-Locus Sequence Typing* (MLST), metodica per la tipizzazione molecolare frequentemente utilizzata per lo studio di numerosi sierotipi di *Salmonella enterica*;
4. Studiare le caratteristiche relative all'origine e ai *pattern* di diffusione del sierotipo Napoli mediante sequenziamento dell'intero genoma e approcci filogenetici e filogeografici;

5. Indagare la relazione filogenetica con altri sierotipi di *S. enterica* subsp. *enterica* (tifoidei e non tifoidei), indagando la presenza di geni *clade*-specifici all'interno del genoma.

La parte relativa all'applicazione della tecnologia NGS e dei metodi filogenetici è stata condotta con la collaborazione della sede di Parma dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna (IZSLER).

# 3. MATERIALI E METODI

### 3.1 Popolazione in studio

Le attività inerenti il progetto di Dottorato, oggetto della presente tesi, sono state svolte presso il laboratorio Enterobatteri Patogeni che, in base alle delibere 6117 del 12 dicembre 2007, 4489 del 13 dicembre 2102 e 5954 del 5 dicembre 2016 della Regione Lombardia, è riconosciuto come di centro di riferimento per la sorveglianza delle infezioni da *Salmonella*. In funzione dei diversi obiettivi, sono state studiate le popolazioni descritte di seguito:

**Obiettivo 1:** allo scopo di tracciare un profilo epidemiologico delle infezioni nell'uomo sostenute dal sierotipo Napoli sono stati inclusi nello studio tutti i casi segnalati in Lombardia nel periodo 2010-2016, attraverso la rete dei laboratori partecipanti al sistema di sorveglianza Enter-Net Italia, coordinato dall'Istituto Superiore di Sanità.

Nella banca dati Enter-Net Italia (<http://www.iss.it/ente>), sono raccolte e rese accessibili (mediante credenziali) le informazioni sull'origine e sulle caratteristiche dei casi e del ceppo isolato (tipo di campione biologico, identificazione microbiologica, caratteristiche di sensibilità agli antibiotici). La scheda utilizzata per la raccolta dei dati è riportata nella Figura 9.



Italia

## SCHEDA DI NOTIFICA FONTE UMANA

Sorveglianza degli enterobatteri patogeni: **SCHEDA PER STIPITI ISOLATI DA FONTE UMANA**

#### A. Origine e caratteristiche del campione biologico

A1. Laboratorio di origine	
Prov.	
A2. Prelievo effettuato nel comune di (località):	
Prov.	
A3. Codice dello stipite assegnato dal laboratorio di origine:	A4. Data prelievo del campione:
A6. Motivo di esecuzione dell'esame colturale:	
<input type="checkbox"/> Non noto <input type="checkbox"/> Inf. acuta <input type="checkbox"/> Inchiesta epidemiologica <input type="checkbox"/> Controllo	

#### U. Informazioni sugli stipiti di provenienza umana

U1. Tipo campione: <input type="checkbox"/> Feci <input type="checkbox"/> Sangue <input type="checkbox"/> Altro specificare	
U2. Cognome e nome del paziente:	
U3. Sesso: <input type="checkbox"/> Non noto <input type="checkbox"/> Maschio <input type="checkbox"/> Femmina	
U4. Data di nascita:	U5. Età, anni:
U6. Comune di residenza del paziente (località):	
Prov.	
U7. Viaggi effettuati nei 30 gg prima dell'insorgenza dei sintomi:	
<input type="checkbox"/> Non noto <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Sì (spec. dove)	
U8. Paziente ospedalizzato: <input type="checkbox"/> Non noto <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Sì	
U9. Alimenti implicati:	
<input type="checkbox"/> Non noto <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Sì (spec.)	
U10. Se alimenti implicati, in base a:	
<input type="checkbox"/> Sospetto <input type="checkbox"/> Dati epidemiologici <input type="checkbox"/> Isolamento microbiologico	

#### C. Identificazione microbiologica e sensibilità agli antibiotici

C1. Identificazione:					
<input type="checkbox"/> Salmonella	<input type="checkbox"/> Shigella	<input type="checkbox"/> Campylobacter			
<input type="checkbox"/> Yersinia	<input type="checkbox"/> E. coli	<input type="checkbox"/> Altro (spec.)			
C2. Tipizzazione:					
C3. Sensibilità agli antibiotici (segnare in ciascuna casella S, I o R):					
NA	AM	CTX	CIP	C	GM
K	S	S3	Te	TMP	AMC
KF	SXT				

#### D. Parte riservata al laboratorio di riferimento (regionale o sovvraregionale)

D1. Codice laboratorio:	D2. Codice assegnato allo stipite dal lab. di riferimento:				
D3. Tipizzazione finale:					
D4. Data tipizzazione:					
D5. Sensibilità agli antibiotici (segnare in ciascuna casella S, I o R):					
NA	AM	CTX	CIP	C	GM
K	S	S3	Te	TMP	AMC
KF	SXT				
D6. Cognome e nome del compilatore:					
Telefono:					
D7. Data di compilazione della scheda:					
D8. Note:					

Figura 9. Scheda Enter-Net Italia per la raccolta dei dati relativi agli stipiti isolati da fonte umana.

I tassi di incidenza medi per provincia e per anno, sono stati calcolati utilizzando i dati ufficiali sulla popolazione residente nei Comuni italiani derivati dalle indagini effettuate presso gli Uffici di Anagrafe, ottenuti consultando il sito ISTAT (Istituto Nazionale di Statistica, [www.demo.istat.it](http://www.demo.istat.it)).

I casi di infezione inclusi nello studio epidemiologico sono tutti casi accertati sulla base dell'isolamento di *Salmonella enterica* sierotipo Napoli da un campione umano (feci, sangue, ecc...).

Obiettivo 2: considerato l'elevato numero degli isolati di S. Napoli pervenuti al Laboratorio Enterobatteri nel periodo 2010-2016 (N=640), è stata effettuata una selezione, mediante un campionamento randomizzato semplice, includendo il 10% dei casi totali. In una seconda fase, sulla base dei primi risultati della tipizzazione, al fine di rappresentare tutte le province lombarde, è stato eseguito un campionamento randomizzato stratificato per provincia, che ha portato alla selezione complessiva di 104 ceppi di S. Napoli.

Obiettivo 3: con l'intento di affiancare al metodo *gold standard* PFGE un'altra tecnica più standardizzabile tra le numerose tecniche di *subtyping* su base genotipica oggi disponibili, la scelta è caduta sul *Multi-Locus Sequence Typing* (MLST); per la messa a punto è stata selezionata una prima serie di 47 stipiti isolati nel periodo 2010-2016, ipotizzando di estendere l'analisi dopo una valutazione del potere discriminante della metodica.

Obiettivo 4: allo scopo di contribuire mediante approcci filogenetici e filogeografici alla conoscenza circa l'origine e il *pattern* di diffusione del sierotipo Napoli nel nord Italia, sono stati selezionati 44 stipiti di S. Napoli isolati da casi umani verificatisi in Lombardia e in Emilia-Romagna tra il 2012 e il 2014, grazie alla collaborazione con la sede di Parma dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna (IZSLER) che funge da referente regionale per la sorveglianza delle infezioni da Salmonella anche nell'ospite uomo.

Obiettivo 5: solo su ceppi che risultassero appartenenti a focolai epidemici con caratteristiche di alta invasività (quantificata in base alla quota di forme setticemiche) nello studio è stato, infine, previsto di indagare la relazione filogenetica con altri sierotipi di *S. enterica* subsp. *enterica* (tifoidei e non tifoidei).

### **3.2 Tipizzazione mediante *Pulsed-Field Gel Electrophoresis* (PFGE)**

L'elettroforesi su gel di agarosio in campo pulsato *Pulsed-Field Gel Electrophoresis* (PFGE) è una tecnica che permette di analizzare l'intero genoma batterico attraverso l'applicazione di un campo elettrico pulsato la cui direzione varia periodicamente di un angolo di 120°, consentendo una

separazione ottimale dei frammenti di DNA, in seguito ad un trattamento con enzimi di restrizione, in funzione del loro peso molecolare. Il ceppo standard di riferimento utilizzato come marcatore di peso molecolare è stato una *Salmonella enterica* sierotipo Braenderup H9812. La PFGE è stata eseguita seguendo il protocollo PulseNet [*Standardized laboratory protocol for molecular subtyping of Escherichia coli O157:H7, non-typhoidal Salmonella serotypes, and Shigella sonnei, by pulsed field gel electrophoresis (PFGE)*, [www.cdc.gov](http://www.cdc.gov)].

I ceppi batterici selezionati sono stati seminati su piastre di terreno Tryptic Soy Agar (*Oxoid, Limited, Basingstoke, UK*) e fatti crescere ponendoli in incubazione a 37 °C per 14-18 ore. Parte della crescita batterica formatasi è stata prelevata con un tampone sterile e sospesa in 2 ml di *buffer* TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8), e sottoposte alla lettura della densità ottica allo spettrofotometro (610 nm) in modo da ottenere un valore di densità ottica (OD) compreso tra 0.8 e 1. Successivamente, 400 µl della sospensione cellulare sono stati trasferiti in provette da 1,5 ml, a cui sono stati aggiunti 20 µl di Proteinasi K 20 mg/ml (*Roche Diagnostics, Indianapolis, USA*). Poiché il DNA cromosomico può danneggiarsi facilmente, le cellule batteriche vengono inglobate in 400 µl di gel di agarosio (*SeaKem Gold Agarose, Lonza, Rockland, USA*) fuso all'1% in *buffer* TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8). La miscela di agarosio è stata, quindi, dispensata in uno stampo (*plug mold*) utilizzato per far solidificare la soluzione di agarosio in blocchetti (*plugs*). Ogni *plug* è stato, successivamente, posto in una soluzione contenente 5 ml di *buffer* di lisi (50 mM Tris, 50 mM EDTA, pH 8 + 1% Sarcosyl) e 25 µl di Proteinasi K 20 mg/ml e incubato per 2 ore in un bagnetto in agitazione a 175 rpm, riscaldato a 54-55 °C. In seguito, i *plug* sono stati sottoposti a due lavaggi con acqua pura ultrasterile e quattro lavaggi con il *buffer* TE. Ogni lavaggio prevede la sospensione dei *plug* in 10 ml di acqua pura ultrasterile o *buffer* TE, precedentemente riscaldati a 54-55 °C, e l'incubazione per 10-15 minuti in un bagnetto riscaldato a 54-55 °C con agitazione a 175 rpm. I blocchetti di agarosio, riposti in 5 ml di *buffer* TE, possono essere conservati per circa 6 mesi a 4 °C. La restrizione del DNA di *Salmonella enterica* viene eseguita mediante l'utilizzo dell'endonucleasi di restrizione *XbaI* (*New England, BioLabs*) (Figura 10). I *plug* sono stati tagliati in pezzetti di dimensioni pari a circa 2 mm, posti in provette contenenti una soluzione composta da 175 µl di acqua ultrasterile, 20 µl di *buffer* di restrizione 10X (*New England, BioLabs*) e 5 µl di enzima *XbaI* 20 U/ml (*New England, BioLabs*) e posti incubati in un bagnetto riscaldato alla temperatura di 37 °C, per 2 ore.



Figura 10. Sito di restrizione dell'enzima *XbaI*.

Successivamente, sono stati preparati 2200 ml di TBE 0,5x, da utilizzare come tampone di corsa, e il gel di agarosio all'1%, pesando 1 g di agarosio e portando a volume con 100 ml di tampone TBE 0,5x. Una volta solidificato il gel, sono stati inseriti i *plug* nei pozzetti, inserendo 4 *plug* di *Salmonella* Braenderup H9812 in corrispondenza dei pozzetti 5, 10, 15 e 20, come indicato dal protocollo PulseNet. La corsa elettroforetica è stata condotta in un *Contour-clamped Homogeneous Electric Field* (CHEF) (BioRad), con le seguenti condizioni di corsa: *initial switch time: 2.2 seconds, final switch time: 63.8 seconds, voltage: 6 V, included angle: 120°, run time: 18-19 hours*. Al termine della corsa elettroforetica, il gel è stato immerso per circa 30 minuti in 400 ml di acqua pura ultrasterile contenenti 40 µl di colorante bromuro di etidio 10 mg/ml, un intercalante degli acidi nucleici che permette la visualizzazione delle bande, in quanto emette fluorescenza arancio-rossa quando illuminato con luce ultravioletta. Per eliminare il rumore di fondo ed eliminare l'eccesso di bromuro di etidio, sono stati effettuati tre lavaggi da 20 minuti l'uno con acqua ultrasterile. Le bande sono state visualizzate mediante lampada UV. L'immagine del gel è stata, infine, analizzata con il software InfoQuest (Bio-Rad), che permette di analizzare i profili di restrizione e rilevare eventuali correlazioni tra i ceppi analizzati. Le similarità tra i profili sono state calcolate usando il coefficiente di Dice con parametri di ottimizzazione e tolleranza fissati all'1,5%. La *clusterizzazione* e la costruzione del dendrogramma sono state effettuate con metodo UPGMA. Un *cluster* è stato definito come un gruppo composto da almeno 3 ceppi aventi un livello di correlazione  $\geq 90\%$ .

### 3.3 Tipizzazione mediante *Multi-Locus Sequence Typing* (MLST)

Il *Multi-Locus Sequence Typing* (MLST) prevede l'estrazione del DNA batterico e l'amplificazione mediante PCR, finalizzata al successivo sequenziamento genico, di frammenti genici di 7 geni *housekeeping*, ovvero che codificano per importanti proteine o enzimi necessari al corretto svolgimento delle funzioni cellulari: *thrA* (aspartokinase + homoserine dehydrogenase), *purE* (phosphoribosylaminoimidazole carboxylase), *sucA* (alpha ketoglutarate dehydrogenase), *hisD* (histidinol dehydrogenase), *aroC* (chorismate synthase), *hemD* (uroporphyrinogen III cosynthase) e *dnaN* (DNA polymerase III beta subunit). La tipizzazione mediante MLST è stata condotta seguendo il protocollo di Achtman *et al.* (2012) [Achtman M *et al.*, 2012].

#### 3.3.1 Estrazione del DNA

Il DNA batterico è stato estratto dai campioni in studio utilizzando un kit commerciale (*GenElute™ Bacterial Genomic DNA Kit, Sigma-Aldrich*). Le colonie batteriche sono state prelevate dalle piastre utilizzando un'ansa sterile, inoculate in provette da 1,5 ml contenente 1 ml di acqua distillata sterile

e centrifugate a 16,000 x *g* per 2 minuti. L'eluato è stato eliminato e il *pellet* è stato risospeso in 180 µl di *Lysis Solution T*. Successivamente, alla sospensione sono stati aggiunti 20 µl di Proteinasi K, e si è proseguito *vortexando* brevemente e ponendo a incubare a 55 °C per 10 minuti. In seguito, sono stati aggiunti 500 µl di *Column Preparation Solution* ad ogni *binding column*, preparate precedentemente, che sono state centrifugate a ≥ 12,000 x *g* per 1 minuto. L'eluato è stato eliminato, e sono stati aggiunti 200 µl di etanolo alle cellule lisate, *vortexando* poi brevemente. Le cellule lisate con l'aggiunta di etanolo sono state trasferite in nuove *binding column*, che sono state centrifugate a ≥ 6500 x *g* per 1 minuto. Le colonnine sono state, quindi, trasferite in nuove *collection tube*, ai quali sono stati aggiunti 500 µl di *Wash Solution 1*. Dopo aver centrifugato a ≥ 6500 x *g* per 1 minuto, le colonnine sono state poste in nuovi *collection tube*, ai quali sono stati aggiunti 500 µl di *Wash Solution Concentrate*. Questi sono stati sottoposti a centrifugazione a ≥ 12,000 x *g* per 3 minuti. Le colonnine sono state, quindi, poste in nuovi *collection tube*, ai quali sono stati aggiunti 200 µl di *Elution Solution*. I *collection tube* sono stati centrifugati a ≥ 6500 x *g* per 1 minuto. Infine, è stato prelevato il surnatante e posto in una nuova provetta da 1,5 ml. Il DNA ottenuto viene conservato a -20 °C fino all'esecuzione della PCR.

### 3.3.2 Amplificazione dei geni *thrA*, *purE*, *sucA*, *hisD*, *aroC*, *hemD* e *dnaN*

La reazione di amplificazione è stata condotta con i seguenti *primers*:

Gene	Primers	Lunghezza del prodotto di amplificazione
<i>thrA</i>	<i>thrA</i> F 5'-GTCACGGTGATCGATCCGGT-3' <i>thrA</i> R 5'-CACGATATTGATATTAGCCCG-3'	852 bp
<i>purE</i>	<i>purE</i> F 5'-GACACCTCAAAGCAGCGT-3' <i>purE</i> R 5'-CGAGAACGCAAACCTTGCTTC-3'	510 bp
<i>sucA</i>	<i>sucA</i> F 5'-CGCGCTCAAACAGACCTAC-3' <i>sucA</i> R 5'-GACGTGGAAAATCGGCGCC-3'	643 bp
<i>hisD</i>	<i>hisD</i> F 5'-GAAACGTTCCATTCCGCGC-3' <i>hisD</i> R 5'-GCGGATTCCGCGCACCAG-3'	894 bp
<i>aroC</i>	<i>aroC</i> F 5'-CCTGGCACCTCGCGCTATAC-3' <i>aroC</i> R 5'-CCACACACGGATCGTGGCG-3'	826 bp
<i>hemD</i>	<i>hemD</i> F 5'-GAAGCGTTAGTGAGCCGTCTGCG-3' <i>hemD</i> R 5'-ATCAGCGACCTTAATATCTTGCCA-3'	666 bp
<i>dnaN</i>	<i>dnaN</i> F 5'-ATGAAATTTACCGTTGAACGTGA-3' <i>dnaN</i> R 5'-AATTTCTCATTCGAGAGGATTGC-3'	833 bp

5 µl di DNA batterico sono stati inoculati in 45 µl di una miscela di reazione così composta:

Reagente	Volume
5X Green GoTaq® Reaction Buffer 150 mM Tris-HCl, pH 8.0 a 25 °C, 500 mM KCl (Promega)	10 µl
dNTP Mix 10 mM (Promega)	1 µl
Primer Forward (30 µM)	1 µl
Primer Reverse (30 µM)	1 µl
GoTaq® DNA Polymerase 5 U/µl (Promega)	0,25 µl
H <sub>2</sub> O	31,75 µl

### 3.3.3 Rilevamento dei prodotti di PCR

Le reazioni di amplificazione sono state condotte in un termociclatore *GeneAmp® PCR System 9700* (*Applied Biosystems*), alle seguenti condizioni: denaturazione iniziale a 94 °C per 4 minuti, seguita da 35 cicli di denaturazione a 94 °C per 30 secondi, *annealing* dei filamenti a 55 °C per 30 secondi (eccetto *hisD*, che ha una temperatura di *annealing* di 58 °C), e amplificazione a 72 °C per 1 minuto, seguita da uno *step* finale di 72°C per 4 minuti.

I prodotti di amplificazione sono stati rilevati mediante la tecnica dell'elettroforesi su gel di agarosio al 2%. Il gel viene preparato pesando 2 g di agarosio e portando a volume con 100 ml di tampone TBE 1x (Tris-borate-EDTA, pH 8.3, a temperatura ambiente). Successivamente, si porta ad ebollizione servendosi di un forno a microonde. Prima che il gel raffreddi, si aggiungono 7 µl di colorante bromuro di etidio (0,01 µg/µl). La miscela viene colata su un supporto e si inseriscono i pettini per la formazione dei pozzetti all'interno del gel. Quando il gel si è solidificato (ovvero quando l'agarosio ha raggiunto il corretto grado di polimerizzazione), viene inserito nella cella elettroforetica, in cui è stato preventivamente aggiunto il tampone TBE 0,5x. A questo punto vengono caricati i campioni e la corsa elettroforetica viene condotta a 120 Volt per circa 30 minuti. La dimensione dei frammenti di DNA viene valutata per confronto con un marker di dimensione nota (*BenchTop 100bp DNA Ladder, Promega*), che viene caricato sullo stesso gel. Infine, il prodotto di amplificazione viene visualizzato mediante lampada UV.

### 3.3.4 Purificazione dei prodotti di amplificazione

Gli amplificati che presentavano bande aspecifiche o poco intense sono stati opportunamente purificati e concentrati attraverso l'uso di un kit commerciale (*NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up, Machery-Nagel*). I prodotti di amplificazione sono stati, innanzitutto, sottoposti ad una corsa elettroforetica su gel di agarosio all'1%, preparato pesando 1,5 g di agarosio, portando a volume con 150 ml di TBE 1x e aggiungendo 10 µl di bromuro di etidio (0,01 µg/µl). Il gel è stato exciso in corrispondenza delle bande di interesse, che sono state poste in provette da 1,5 ml e pesate, servendosi di una bilancia di precisione. La prima fase prevede l'aggiunta del *binding buffer NTI*. Per

ogni 100 mg di gel sono stati aggiunti 200 µl di *buffer NTI*. Questo *buffer* contiene un indicatore di pH: il pH ottimale del campione, che garantisce una resa ottimale del kit, ha un valore intorno a 5-6 (l'indicatore appare di colore giallo). Se il pH del campione è 6-7 (indicatore di colore verde) o > 7 (indicatore di colore blu), è necessario ristabilire il valore ideale, aggiungendo altro *buffer NTI*, oppure 4 M di sodio acetato (NaAc, pH 5.0), o ancora una piccola quantità di acido cloridrico (HCl), finché il colore dell'indicatore ritorna giallo. Successivamente, i campioni sono stati incubati nel termoblocco a 50 °C per 5-10 minuti, vortexando ogni 2-3 minuti, fino ad ottenere la completa dissoluzione del gel. A questo punto, sono stati caricati 700 µl di campione in una colonnina posta all'interno di un tubo di raccolta da 2 ml, e sono stati centrifugati per 30 secondi a 11,000 x g. L'operazione è stata ripetuta con il campione rimanente. Dopo aver svuotato il tubo di raccolta, i campioni sono stati sottoposti a due lavaggi consecutivi con il *wash buffer NT3*, preparato aggiungendo 200 ml di etanolo 96-100%. I due lavaggi sono stati entrambi eseguiti aggiungendo 700 µl di *NT3* e centrifugando per 30 secondi a 11,000 x g, per ridurre al minimo le contaminazioni. Per rimuovere completamente il *buffer NT3*, è stata effettuata una centrifugazione a 11,000 x g per 1 minuto. Per assicurarsi di rimuovere ogni traccia di etanolo residua, le colonnine sono state incubate nel termoblocco a 70 °C per 2-5 minuti. Successivamente, la colonna è stata inserita in una nuova provetta da 1,5 ml, e vengono aggiunti 20 µl di *elution buffer NE*. Le provette sono state, quindi, incubate a temperatura ambiente per 1 minuto e, infine, centrifugate a 11,000 x g per 5 minuti. Il DNA così purificato e concentrato è stato conservato a 4 °C fino al momento del sequenziamento.

### 3.3.5 Sequenziamento

Il sequenziamento degli amplificati è stato condotto da un *service* esterno al Dipartimento, mediante un sequenziatore automatico a tecnologia capillare ABI PRISM® 3100 *Genetic Analyser* (*Applied Biosystems*), il quale assicura la decodifica di sequenze lunghe fino a 1000-1200 bp. Al laboratorio vengono inviate provette, adeguatamente etichettate, contenenti: 5 µL del DNA purificato e 5 µL del *primer forward* (5 pmoli/µL). Il metodo utilizzato è il Sanger, basato sulla tecnologia dell'elettroforesi capillare. Viene utilizzato un kit commerciale (*ABI PRISM™ Ready Reaction DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing, Applied Biosystems*), contenente una soluzione composta di ddNTPs (dideossinucleotidi terminatori) marcati con 4 fluorocromi diversi (dTTP 15,79 mM, Tris-HCl 48,42 mM pH 9,1, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4,21 mM e l'enzima termostabile *AmpliTaq® FS DNA-polymerase* (0,42U/mL). I frammenti vengono separati sulla base delle loro dimensioni mediante elettroforesi capillare dotata di un *detector laser* a fluorescenza e vengono individuati grazie allo specifico segnale di fluorescenza che emettono. La sequenza è mostrata in forma di picchi colorati

(elettroferogramma), dove ogni picco corrisponde alla posizione di ciascun nucleotide nella sequenza. Normalmente, l'elettroferogramma è interpretato in modo automatico dal software utilizzato per il sequenziamento. Le sequenze ottenute con il sequenziatore automatico cominciano approssimativamente 15-20 basi dopo la sequenza del *primer*. Inoltre, il sequenziatore automatico opera una singola lettura del segnale e questo può comportare la generazione di errori o ambiguità in qualche punto; per questo motivo, è sempre necessario ricontrollare e correggere la sequenza in base all'elettroferogramma, tramite l'utilizzo del programma bioinformatico BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/page2.html>).

### 3.3.6 Analisi dei dati di sequenza

L'analisi dei dati di sequenza è stata eseguita utilizzando il programma BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/page2.html>), che permette di importare le sequenze ottenute dai diversi *primers*, assemblare una sequenza consenso grazie ad un confronto con una sequenza di riferimento e ottenere la successione corretta di basi azotate delle sequenze dei campioni in studio per poter effettuare, in un secondo momento, l'analisi filogenetica.

### 3.3.7 Editing delle sequenze

Tutte le sequenze nucleotidiche ottenute dalla lettura dell'elettroferogramma sono state raggruppate in file di testo in formato FASTA. Ogni singola sequenza, in formato FASTA, compare con una riga di descrizione, rappresentata dal nome della sequenza preceduto dal carattere ">", seguita da una serie di righe contenenti la sequenza nucleotidica vera e propria, identificata con le lettere delle 4 basi azotate.

### 3.3.8 Sottomissione delle sequenze nel *Salmonella enterica* MLST database

Le sequenze dei frammenti dei 7 geni di interesse sono state sottomesse nel *Salmonella enterica* MLST database dell'Università di Warwick (<http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Senterica>), nel quale ciascun isolato viene codificato con una serie numerica, dove ogni numero corrisponde al tipo di allele presente per ognuno dei loci considerati. Con l'individuazione delle variazioni genetiche nei diversi loci, è possibile definire per ogni *locus* un allele, e la combinazione degli alleli genererà, per ogni ceppo, un relativo *sequence type* (ST). Il database consente, in aggiunta, di determinare la relazione genetica tra gli ST, per tracciare gli isolati di ogni ST nei vari Paesi che li hanno caratterizzati, fornendo il software on-line eBURST (*Based Upon Related Sequence Types*): tenendo conto dei profili allelici dei ceppi, permette di dividere gli isolati in complessi clonali, denominati

gruppi eBURST (eBG), che comprendono isolati (che possono appartenere a diversi ST) che presentano un elevato livello di similarità genetica [Achtman M et al., 2012; Feil EJ et al., 2004].

### **3.4 Whole-Genome Sequencing**

Il sequenziamento dell'intero genoma degli stipti di *S. Napoli* isolati da casi umani verificatisi in Lombardia e in Emilia-Romagna tra il 2012 e il 2014 è stato condotto presso la sede di Parma dell'IZSLER. Il DNA è stato estratto mediante l'utilizzo del kit *DNeasy blood and tissue kit* (Qiagen), secondo il protocollo fornito dal produttore, che prevede 4 fasi distinte: lisi del campione, legame del DNA, lavaggi e eluizione del DNA. Il DNA così ottenuto è stato utilizzato per la preparazione della *sequencing library* (libreria di sequenziamento), che rappresenta il primo *step* di tutte le reazioni di sequenziamento, e prevede 3 passaggi:

1. frammentazione e dimensionamento del campione ad una lunghezza predefinita
2. aggancio degli adattatori (*adapters*) alle estremità dei frammenti ottenuti
3. quantificazione della libreria ottenuta

La metodica utilizzata per la creazione delle librerie è quella prevista dal protocollo del kit *Nextera XT sample preparation* (*Illumina*), che permette la frammentazione del DNA e l'aggancio immediato di corte sequenze nucleotidiche denominate adattatori, tramite l'azione di una trasposasi, allo scopo di ancorare i frammenti di DNA al supporto sul quale avverrà la reazione di sequenziamento. L'insieme dei frammenti di DNA preparati tramite l'aggiunta degli adattatori costituisce la *sequencing library*. I frammenti della *sequencing library* vengono amplificati e sequenziati fino a ottenere numerose copie complementari di ciascun frammento, che vengono denominate *reads*. Il sequenziamento può essere eseguito a partire da una sola estremità del frammento (sequenziamento con *single-end reads*) o partendo da entrambe le estremità e proseguendo in direzioni opposte (sequenziamento con *paired-end reads*). La corsa della libreria di frammenti ottenuti è stata condotta sulla piattaforma *Illumina MiSeq* (*Illumina*), con chimica 2x250 bp *paired-end*. Il controllo di qualità delle *reads* è stato effettuato mediante il software *FastQC* (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>), che permette di scartare le *reads* di bassa qualità.

### **3.5 Analisi filogenetica mediante i metodi Bayesiani**

L'analisi filogenetica è volta a studiare le distanze evolutive esistenti tra le sequenze in esame; tali distanze sono rappresentate attraverso alberi filogenetici, che costituiscono dei grafici bidimensionali, composti da nodi connessi tra loro tramite rami. I nodi terminali rappresentano i

taxa attuali, mentre i nodi interni rappresentano quelli ancestrali. Le relazioni filogenetiche vengono definite attraverso la topologia dell'albero: la distribuzione dei nodi e la lunghezza dei rami forniscono indicazioni sulla divergenza evolutiva esistente tra i diversi taxa, permettendo di individuare gruppi monofiletici e linee evolutive.

I metodi filogenetici computazionali possono risultare utili in un contesto di Sanità Pubblica, per valutare caratteristiche microbiologiche e virologiche importanti (come ad esempio le forze di pressione selettiva che agiscono su una popolazione o il suo andamento di crescita), per analizzare alcune caratteristiche dell'infezione (come il numero riproduttivo di base di un'epidemia) e per stimare con buona precisione il momento in cui un dato microrganismo ha iniziato a diffondersi nella popolazione.

In tempi recenti, le analisi filogenetiche basate sugli SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*), presenti in un elevato numero e distribuiti lungo tutto il genoma, si sono rivelate strumenti molto utili nelle indagini forensi, nel monitoraggio delle epidemie e nell'identificazione di quelle differenze tra i vari stipti che determinano, ad esempio, la virulenza e la resistenza a determinati antibiotici [Gardner SN, Hall BG, 2013].

L'identificazione degli SNPs all'interno dei genomi di *S. Napoli* precedentemente sequenziati è stata effettuata servendosi del programma bioinformatico kSNP3.0 [Gardner SN, Hall BG, 2013], che analizza le *reads* ottenute, in formato FASTA, impostando la lunghezza della sequenza che "fiancheggia" un determinato SNP (*flanking sequence*) pari a 21. Dal momento che il software non è in grado di identificare SNPs troppo vicini tra loro, il protocollo consiglia, per i batteri, di impostare la lunghezza della *flanking sequence* a 19 o 21 [Gardner SN and Hall BG, 2013]. Successivamente, è stato costruito un albero filogenetico, mediante il programma RAxML v.8 (Stamatakis), utilizzando il metodo *Maximum Likelihood* e il modello *General Time Reversible* (GTR). La robustezza dell'albero filogenetico ottenuto è stata determinata tramite l'analisi di *bootstrap* [Felsenstein J, 1985], con un valore pari a 100 replicati.

Gli alberi filogenetici, i parametri dei modelli, gli *evolutionary rates* e le modalità di crescita della popolazione sono stati co-stimati utilizzando un metodo Bayesiano, basato sull'algoritmo *Markov Chain Monte Carlo* (MCMC), implementato nel pacchetto del software BEAST v.1.8.4 [Drummond A, Rambaut A, 2007]. La statistica Bayesiana calcola la probabilità a posteriori di un albero (ovvero la probabilità di ottenere un certo albero in base ai dati forniti) mediante l'algoritmo Markov Chain Monte Carlo (MCMC). Il metodo Monte Carlo prevede l'utilizzo di simulazioni casuali, mentre le catene di Markov sono un modello di sequenze di eventi dove la probabilità di un evento dipende

dall'evento precedente. L'analisi inizia a partire da un albero iniziale (i cui parametri sono definiti casualmente) con una data probabilità a posteriori; successivamente viene variato un parametro (la topologia oppure un parametro del modello), costruito un nuovo albero e ne viene calcolata una nuova probabilità a posteriori: se il nuovo albero generato ha una probabilità maggiore, il parametro variato viene accettato, in caso contrario viene accettato solamente entro un certo valore. Tutti questi passaggi costituiscono una così detta generazione. Il valore di *likelihood* dell'albero iniziale è molto basso ma, mano a mano che la catena si muove verso regioni con probabilità posteriori più elevate, i valori di *likelihood* incrementano rapidamente (*burn-in*) fino a raggiungere un plateau (ad indicare che la catena sta convergendo sulla distribuzione target). I valori campionati durante il *burn-in* risultano eccessivamente influenzati dalla scelta dell'albero iniziale e quindi di solito vengono scartati [Ronquist F et al., 2009].

In questo studio, sono stati testati sia il modello *strict* che il modello *relaxed*, con una distribuzione lognormale non correlata. Tre modelli demografici parametrici (*constant population size*, *exponential*, *logistic growth*) e il modello non parametrico *Bayesian skyline plot* (BSP) sono stati confrontati con un test denominato *Bayes Factor* (BF). implementato in BEAST [Drummond A, Rambaut A, 2007]. Il BF rappresenta il rapporto tra i valori di *likelihood* di due modelli:

$$BF = P(X/M0)/P(X/M1)$$

Dove X rappresenta i dati e M0 e M1 i due modelli. Maggiore è tale valore, più forte è l'evidenza contro M1 [Ronquist F et al., 2009]. In accordo con Kass e Raftery, la forza dell'evidenza contro la H0 è stata definita come segue:  $2\ln BF < 2\ln BF < 2\ln BF_{10}$  = molto forte. Valori negativi di  $2\ln BF$  indicano invece evidenze in favore della H0 [Kass RE and Raftery AE, 1995]. Solo valori  $> 6$  sono stati considerati significativi. Il supporto statistico per i determinati *clade* è stato ottenuto calcolando la probabilità a posteriori di ogni *clade* monofiletico. Per valutare se un gruppo è monofiletico viene valutata la proporzione delle volte in cui gli alberi campionati contengono tale gruppo monofiletico. L'albero che si ottiene è equivalente ad un albero di consenso di bootstrap, ma invece dei valori di *bootstrap*, ai nodi è possibile leggere le probabilità posteriori (*posterior probability*).

Le catene MCMC sono state fatte funzionare per almeno 50 milioni di generazioni e campionate ogni 5000 step. La convergenza è stata valutata sulla base dell'effettiva dimensione del campione (*effective sampling size*, ESS), ovvero il numero effettivo di campioni indipendenti a cui è equivalente la catena, dopo un 10% *burn-in* mediante l'utilizzo del software Tracer v.1.6 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer/>). Bassi valori di ESS indicano un alto grado di correlazione

tra i campioni che quindi non rappresentano in modo accurato la distribuzione. Solo le ESS  $\geq 200$  sono state accettate. L'incertezza nelle stime è stata indicata come *highest posterior density* (HPD) al 95%, intervallo della distribuzione che contiene il 95% dei valori campionati.

### 3.6 Analisi filogeografica

L'approccio filogeografico si basa sull'esistenza di una relazione tra l'evoluzione molecolare di un organismo e la sua distribuzione spaziale. Sono attualmente disponibili diversi approcci filogenetici per inferire la distribuzione spaziale di un organismo sulla base della filogenesi dei suoi geni. In questo lavoro, è stato utilizzato un approccio Bayesiano, implementato nel programma BEAST v.1.8.4 [Drummond A, Rambaut A, 2007]. Tale approccio consente di ricostruire la località più probabile dei nodi interni esclusivamente sulla base della conoscenza del luogo di isolamento delle sequenze incluse nell'analisi. Il modello utilizzato è detto *Bayesian Stochastic Search Variable Selection* (BSSVS). Gli alberi ottenuti vengono rappresentati con il *Maximum Clade Credibility* (MCC) *tree*, cioè l'albero con la più alta probabilità posteriore dopo un *burn-in* del 10%, utilizzando BEAST. La località più probabile per ogni nodo viene evidenziata contrassegnando le ramificazioni dell'albero con diversi colori. Queste analisi permettono di stimare la diffusione geografica di *S. Napoli* in relazione al tempo reale e di ricostruire, quindi, la sua storia epidemiologica.

Le sequenze di *S. Napoli* sono state suddivise in 4 gruppi, sulla base dell'area geografica di origine: 1) gruppo degli isolati con origine nella Città Metropolitana di Milano (MIMB); 2) gruppo degli isolati con origine nella zona delle Prealpi occidentali, che include il Lago di Como e il Lago Maggiore (CLV); 3) gruppo degli isolati con origine nella zona centro-orientale della Valle del Po (ERPV); 4) gruppo degli isolati con origine dell'area delle Prealpi orientali (province di Sondrio e Brescia, SOBS).

Inoltre, per la ricostruzione filogeografica, le sequenze sono state sottoposte ad analisi di migrazione mediante il programma SPREAD (<http://www.kuleuven.be/aidslab/phylogeography/SPREAD.html>), che riproduce visivamente la diffusione del patogeno nelle regioni studiate, utilizzando Google Earth (<https://www.google.com/earth/>).

Le coordinate dei nodi interni e della radice dell'albero sono state stimate utilizzando un modello di diffusione browniano (*Brownian diffusion model*), confrontato con tre diversi modelli *relaxed random walk* (RRW) [Lemey P et al., 2010], caratterizzati, rispettivamente, da una velocità di diffusione con distribuzione Gamma (GA), una distribuzione Cauchy (CA) e una distribuzione Lognormal (LN). La comparazione del BF tra i diversi modelli è stata eseguita mediante le analisi *path sampling* (PS) e *stepping-stone* (SS) [Baele G et al., 2012], implementate nel pacchetto del software

BEAST v.1.8.4 [Drummond A, Rambaut A, 2007]. I dati sono stati, infine, convertiti in linguaggio KML (*Keyhole Markup Language*), un linguaggio creato per gestire dati geospaziali in tre dimensioni in Google Earth.

### 3.7 Genomica comparativa

I ceppi appartenenti a focolai epidemici sono stati sottoposti a sequenziamento dell'intero genoma presso la sede di Parma dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna (IZSLER), al fine di indagare la relazione filogenetica con altri sierotipi di *S. enterica* subsp. *enterica*.

Il DNA è stato estratto mediante l'utilizzo del kit *GeneAll exgene tissue SV* (*GeneAll Biotechnology*), secondo il protocollo fornito dal produttore, e il sequenziamento è stato condotto sulla piattaforma Illumina MiSeq. Le librerie sono state preparate mediante kit *Nextera XT sample preparation* (Illumina), come descritto precedentemente. In totale, sono state generate 3606256 sequenze *paired-end*. Per la fase di allineamento delle *reads* e per l'assemblaggio del genoma è stato utilizzato il software Mira versione 4.0.4, che ha permesso di generare un totale di 359 *contigs* (tratti di sequenza assemblati senza discontinuità). Complessivamente, è stata ottenuto un *coverage* del genoma pari a 4631315 bp, con una percentuale di G+C del 53%.

Successivamente, sono stati selezionati 93 geni appartenenti al *core*-genoma, selezionati in modo *random* tra tutti i geni presenti nel *core*-genoma di *S. enterica* subsp. *enterica*, così come descritto da den Bakker e colleghi [den Bakker HC et al., 2011].

Le sequenze relative ai 93 geni di interesse sono state concatenate mediante il programma bioinformatico BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>), generando una sequenza di lunghezza pari a 73761 nucleotidi [den Bakker HC et al., 2011]. Tale sequenza è stata confrontata con le sequenze di altri 15 diversi sierotipi di *S. enterica* subsp. *enterica*, rappresentanti del *clade* A e del *clade* B [den Bakker HC et al., 2011], riportate in tabella 4 con i relativi *Accession Number*.

L'albero filogenetico di *S. Napoli* e dei 15 sierotipi rappresentanti dei due *clade* è stato costruito mediante il programma bioinformatico MEGA v.7.0.21 (<http://www.megasoftware.net>), utilizzando la sequenza di *S. Arizonae* con *Accession Number* CP0008800 come *outgroup*. L'albero filogenetico è stato costruito con il metodo della Massima Verosimiglianza (*Maximum Likelihood*) e il modello Tamura-Nei. La robustezza dell'albero ottenuto è stata determinata tramite l'analisi di *bootstrap*, con un valore pari a 200 replicati.

La presenza dei geni SPI-18,  $\beta$ -glucuronidasi e *cdtB*, caratteristici dei sierotipi Typhi e Paratyphi [den Bakker HC et al., 2011], è stata verificata mediante l'utilizzo del programma bioinformatico BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

Tabella 4. Sequenze dei 15 sierotipi rappresentanti dei *clade* A e B utilizzate per la comparazione genomica con *S. Napoli*.

<b>Sierotipo</b>	<b>Accession Number</b>	<b>Clade</b> [den Bakker HC et al., 2011]
<i>S. 4,[5],12:i:-</i>	ABAO00000000	A
<i>S. Choleraesuis</i>	AE017220	A
<i>S. Dublin</i>	CP001144	A
<i>S. Enteritidis</i>	AM933172	A
<i>S. Heidelberg</i>	CP001120	A
<i>S. Johannesburg</i>	AFCP00000000	B
<i>S. Minnesota</i>	AFCQ00000000	B
<i>S. Montevideo</i>	AFCS00000000	B
<i>S. Newport</i>	CP001113.1	A
<i>S. Paratyphi A</i>	FM200053	A
<i>S. Schwarzengrund</i>	ABEJ00000000	B
<i>S. Typhi</i>	AL513382	A
<i>S. Typhimurium</i>	FQ312003	A
<i>S. Urbana</i>	AFCW00000000	B

## 4. RISULTATI

#### 4.1 Epidemiologia descrittiva

Nel periodo compreso tra il 2010 e il 2016, in Lombardia, il sistema Enter-Net ha rilevato 885 casi di infezione umana da *S. Napoli*, su un totale di 12962 casi di salmonellosi (6,8%).

I casi di *S. Napoli* provenivano da soggetti di età compresa tra 0 e 97 anni (età mediana: 6 anni). La distribuzione per classi di età è descritta dalla Figura 11: quasi la metà dei casi (433/885: 48,9%) di infezione da *S. Napoli* hanno riguardato soggetti di età compresa tra 0 e 5 anni, con una modesta prevalenza dei soggetti di sesso maschile (498/885: 56,2%).

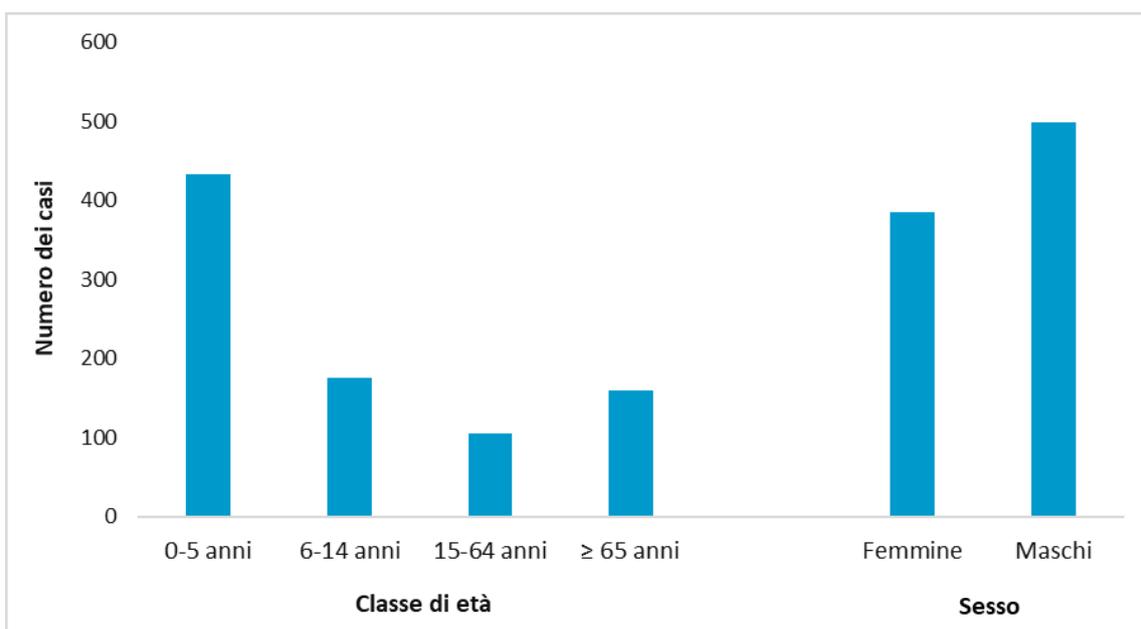


Figura 11. Distribuzione per classi di età e sesso dei casi di *S. Napoli* verificatisi in Lombardia (2010-2016).

*S. Napoli* è stata isolata prevalentemente da feci (831/855: 93,9%), mentre nel 5,6% (50/885) dei casi è stata isolata da sangue; nei rimanenti casi, l'isolamento è stato ottenuto da campioni di urina (3 casi) e da espettorato (1 caso).

Tabella 5. Casi e tasso di incidenza di *S. Napoli* in Lombardia nel periodo 2010-2016.

Anno	Popolazione	N° dei casi	Incidenza per 100 000 abitanti
2010	9600951	122	1,27
2011	9663872	140	1,45
2012	9700881	133	1,37
2013	9794525	142	1,45
2014	9973397	179	1,79
2015	10005482	101	1,01
2016	10008349	68	0,68
Tot	9821065	885	1,29

L'incidenza media dei casi di infezione da S. Napoli in Lombardia nel periodo dello studio è risultata pari a 1,29 per 100 000 abitanti, con un *range* compreso 0,68 per 100 000 abitanti (2016) e 1,79 (2014) (Tabella 5). Analizzando i tassi di incidenza provinciali e comparandoli con la media lombarda, si osserva un tasso di incidenza superiore a quello medio regionale per le province di Como, Lecco, Monza Brianza e Varese (Figura 12). Il valore di incidenza più basso (0,72 per 100 000 abitanti) è stato riscontrato nella provincia di Brescia (Figura 13).

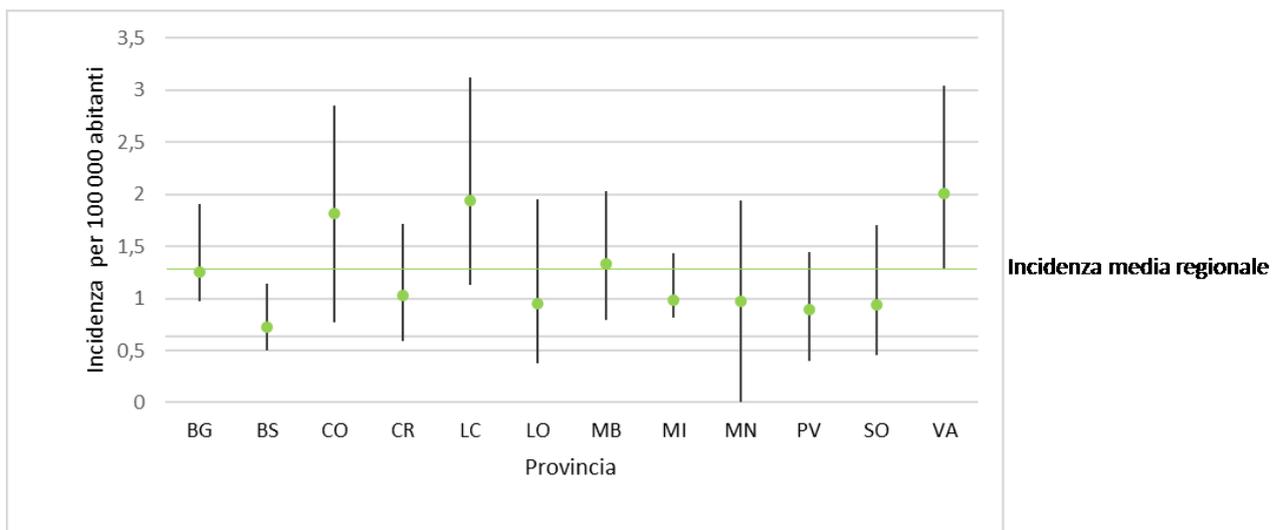


Figura 12. Tassi di incidenza medi provinciali e tasso di incidenza medio annuale regionale (2010-2016) e IC 95%.

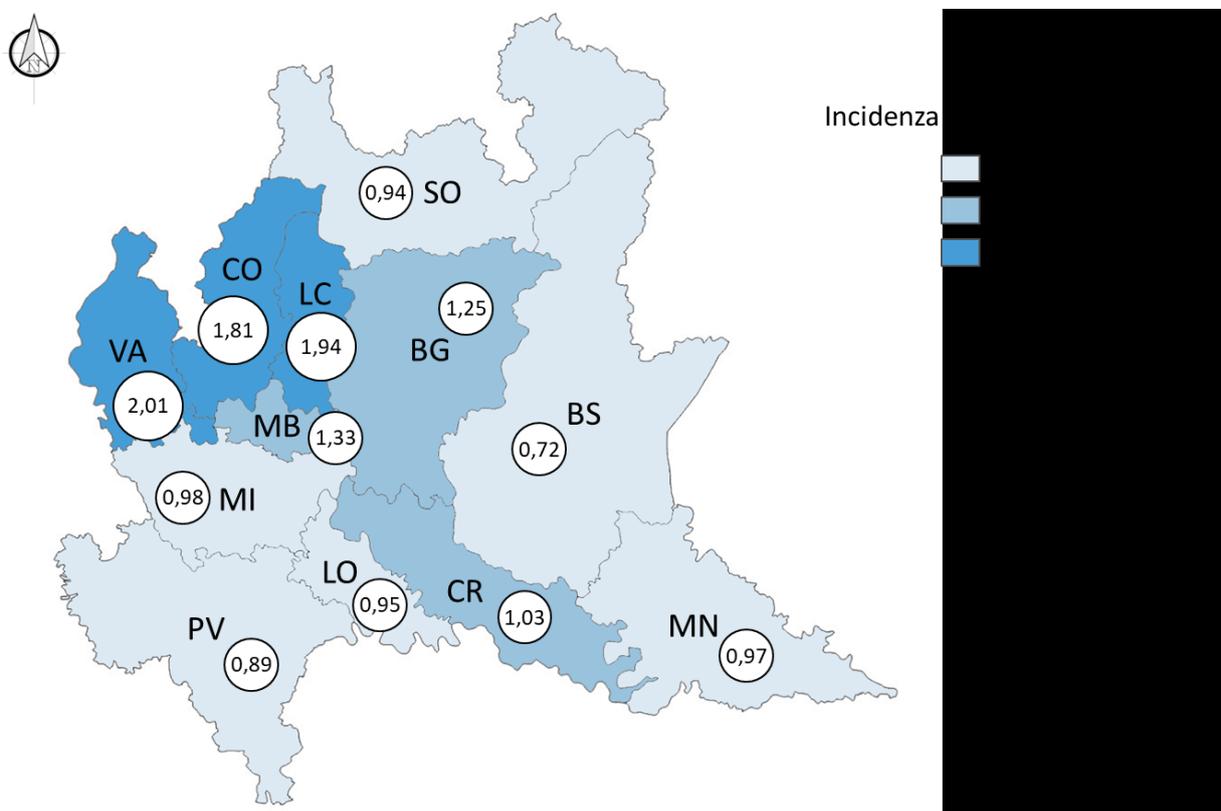


Figura 13. Tassi di incidenza medi provinciali per 100 000 abitanti (2010-2016).

L'andamento stagionale dei casi, rappresentato in Figura 14, ha mostrato una netta stagionalità: la maggior parte dei casi (685/885: 77,4%) è risultata concentrata nei mesi estivi, tra giugno e ottobre, per tutti gli anni considerati.

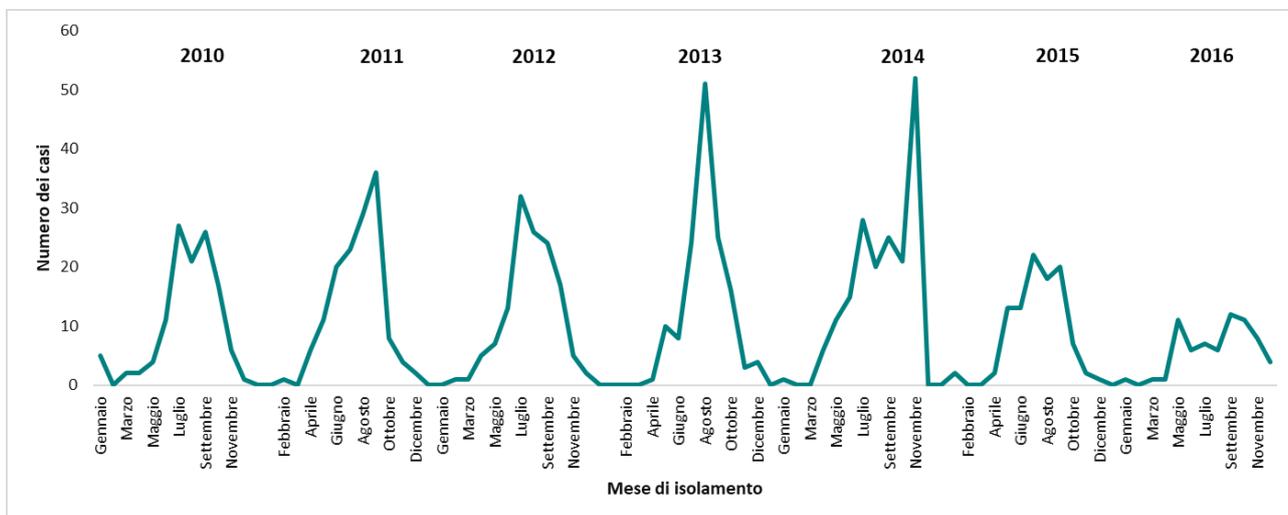


Figura 14. Andamento stagionale dei casi di infezione di S. Napoli in Lombardia (2010-2016).

Nell'andamento stagionale dei casi verificatisi nel 2014, è possibile notare un picco nei mesi di ottobre e novembre (Figura 14): in questo periodo, S. Napoli ha dato luogo a un focolaio epidemico in 4 scuole primarie in provincia di Milano. Le indagini epidemiologiche sull'evento sono state svolte in collaborazione con l'ASL di Milano 1 [Huedo P et al., 2016]. In Figura 15 è riportata la curva epidemica, che descrive l'andamento temporale del focolaio: il primo caso risale al 21 ottobre, l'ultimo caso al 15 novembre.

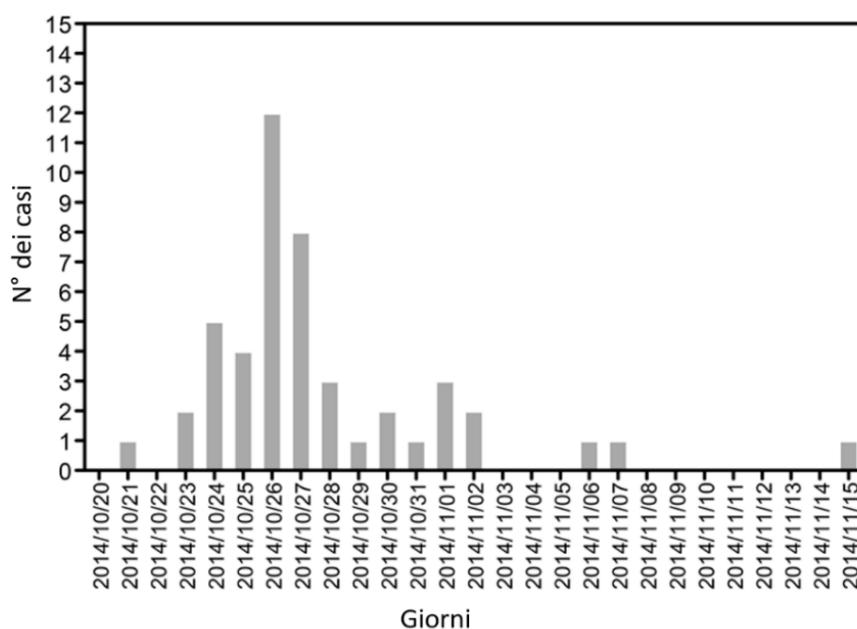


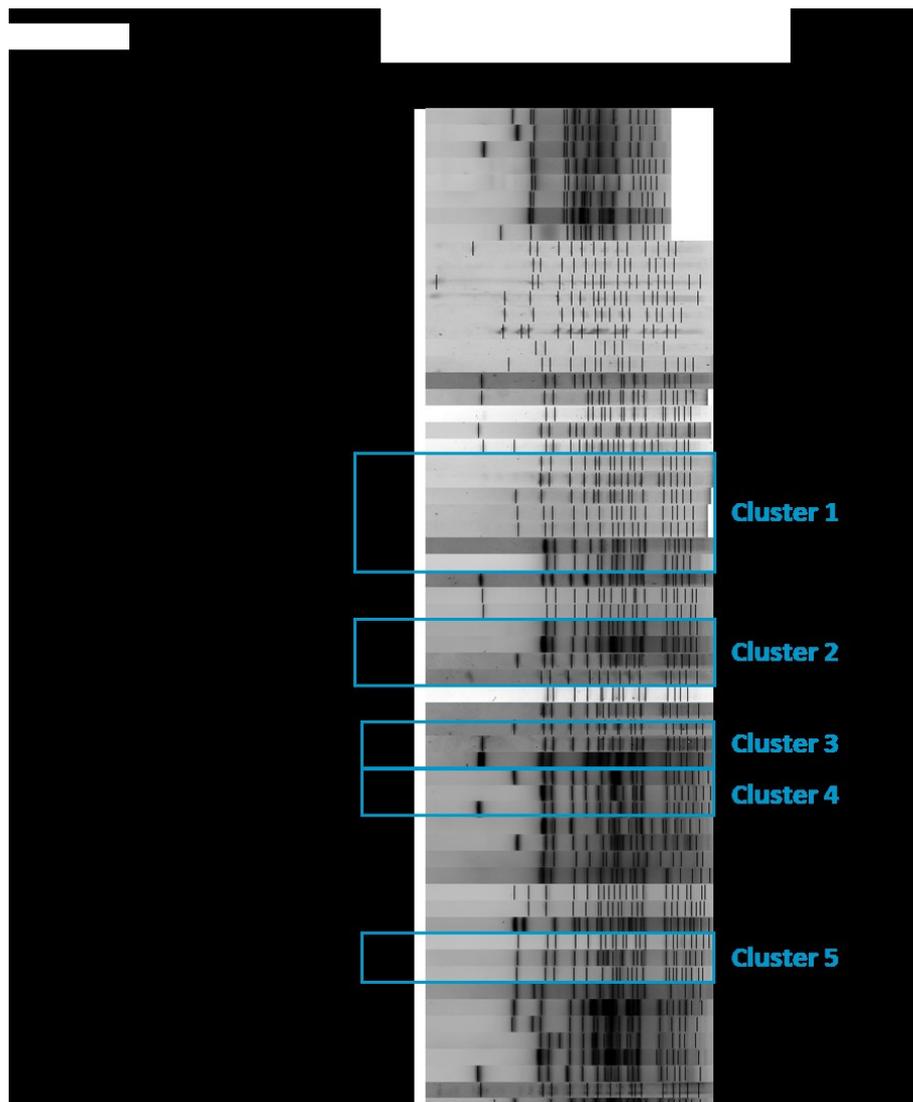
Figura 15. Curva epidemica che descrive l'andamento temporale del focolaio (Milano, 2014).

Dal momento che l'unico punto in comune tra le scuole coinvolte è stato il servizio di *catering* che gestiva il servizio mensa, l'ipotesi è che il focolaio si sia verificato in seguito all'ingestione di un alimento contaminato da *S. Napoli*, non identificato durante le indagini. Complessivamente, sono stati confermati 47 casi (1 professore e 46 bambini con età mediana 8,9 anni). Quattordici pazienti (29,8%), tra i quali 6 bambini (12,8%) che presentavano emocolture positive, hanno richiesto ospedalizzazione.

## 4.2 Epidemiologia molecolare

### 4.2.1 Tipizzazione mediante *Pulsed-Field Gel Electrophoresis* (PFGE)

I risultati delle analisi mediante PFGE mostrano che, tra i 104 stipiti considerati, sono stati rilevati 67 pulsotipi *Xba*I, e hanno evidenziato la presenza di 8 *cluster*, nei quali sono inclusi 30 stipiti (28,9%). I rimanenti 74 stipiti comprendono 15 coppie di isolati con una correlazione  $\geq 90\%$  e 44 isolati per i quali non sono evidenziabili correlazioni con altri ceppi (Figura 16).



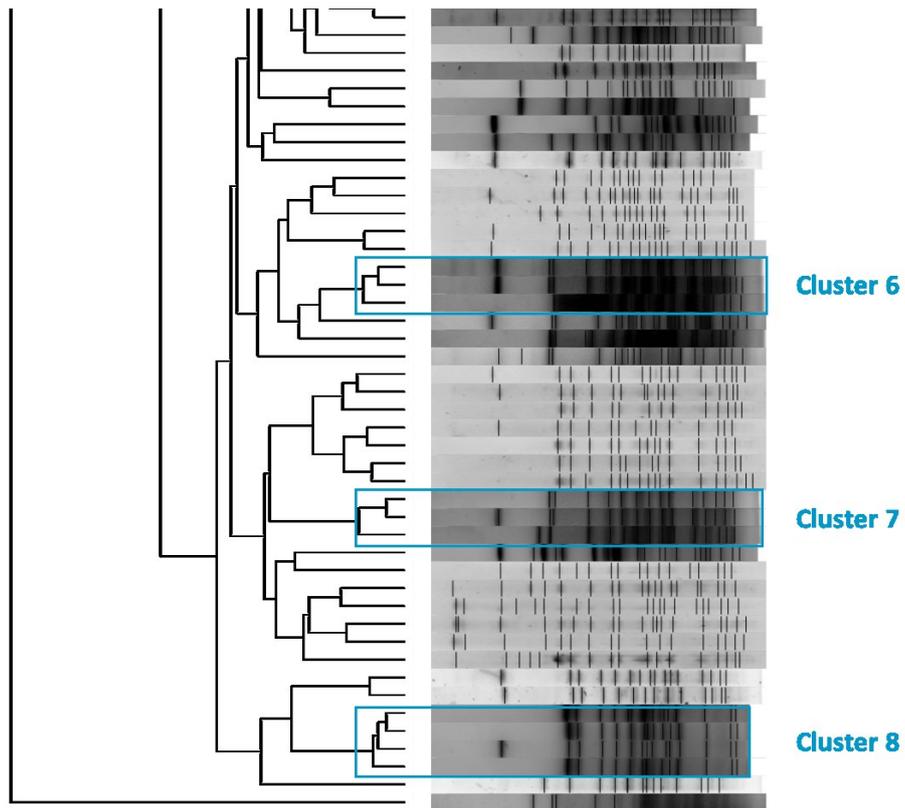


Figura 16. Dendrogramma dei profili *XbaI* e *cluster* di *S. Napoli* identificati in Lombardia (2010-2016).

In Tabella 6 sono riassunte le principali caratteristiche dei casi di infezione da *S. Napoli* inclusi nei *cluster*.

Tabella 6. Descrizione dei *cluster XbaI* identificati.

<b>Cluster</b>	<b>N° isolati</b>	<b>Provincia di isolamento</b>	<b>Data di isolamento</b>
<b>1</b>	7	MI	Maggio 2014
		MI	Maggio 2016
		MI	Novembre 2014
		PV	Agosto 2015
		PV	Settembre 2015
		PV	Settembre 2015
		VA	Luglio 2014
		VA	Luglio 2014
<b>2</b>	4	CO	Luglio 2011
		MB	Luglio 2016
		MB	Settembre 2016
		VA	Settembre 2011
<b>3</b>	3	LC	Agosto 2012
		MI	Agosto 2016
		MI	Ottobre 2016
<b>4</b>	3	LC	Giugno 2012
		LO	Gennaio 2013
		MI	Settembre 2012
<b>5</b>	3	BS	Settembre 2010
		CO	Luglio 2010
		MI	Luglio 2012
<b>6</b>	3	MB	Luglio 2010
		MB	Novembre 2010
		MB	Ottobre 2010
<b>7</b>	3	CO	Agosto 2010
		VA	Aprile 2010
		VA	Giugno 2010
<b>8</b>	4	MI	Settembre 2013
		MI	Luglio 2013
		MI	Agosto 2013
		MI	Luglio 2013

#### 4.2.2 Tipizzazione mediante *Multi-Locus Sequence Typing (MLST)*

I risultati della tipizzazione mediante MLST hanno rivelato che tutti gli isolati in studio (N=47) appartengono al *sequence type (ST)* 474 (combinazione allelica *aroC*, *dnaN*, *hemD*, *hisD*, *purE*, *sucA* e *thrA* rispettivamente 161-147-96-178-155-12-142), il quale risulta costituito esclusivamente da stipti di *S. Napoli* isolati in Italia, Francia e Regno Unito, nel periodo 2001-2014 [<http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Senterica>] (Tabella 7).

Tabella 7. Caratteristiche del *Sequence Type* (ST) 474 [http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Senterica].

ST	Tipo di campione	Anno di isolamento	Luogo di isolamento	Sierotipo	<i>aroC</i>	<i>dnaN</i>	<i>hemD</i>	<i>hisD</i>	<i>purE</i>	<i>sucA</i>	<i>thrA</i>
474	Umano	2003	Francia	Napoli	161	147	96	178	155	12	142
474	Umano	2005	Francia	Napoli	161	147	96	178	155	12	142
474	Umano	2001	Italia	Napoli	161	147	96	178	155	12	142
474	Umano	2014	Regno Unito	Napoli	161	147	96	178	155	12	142
474	Umano	2014	Regno Unito	Napoli	161	147	96	178	155	12	142
474	Umano	2014	Italia	Napoli	161	147	96	178	155	12	142

#### 4.2.3 Analisi filogenetica mediante i metodi Bayesiani

L'analisi filogenetica condotta su 44 stipiti di *S. Napoli* isolati da casi umani verificatisi in Lombardia e in Emilia-Romagna tra il 2012 e il 2014 ha permesso di generare l'albero filogenetico riportato in Figura 17, che evidenzia la suddivisione degli isolati in due *clade* (A e B) ben distinti tra loro, sulla base dell'aera geografica di origine. Il *clade* A include complessivamente 16 isolati, 10 provenienti dalla Lombardia e 6 dall'Emilia-Romagna. Nel *clade* B sono inclusi 28 isolati, 24 provenienti dalla Lombardia (incluso l'isolato responsabile del focolaio che si è verificato in provincia di Milano nel 2014) e 4 provenienti dall'Emilia-Romagna.

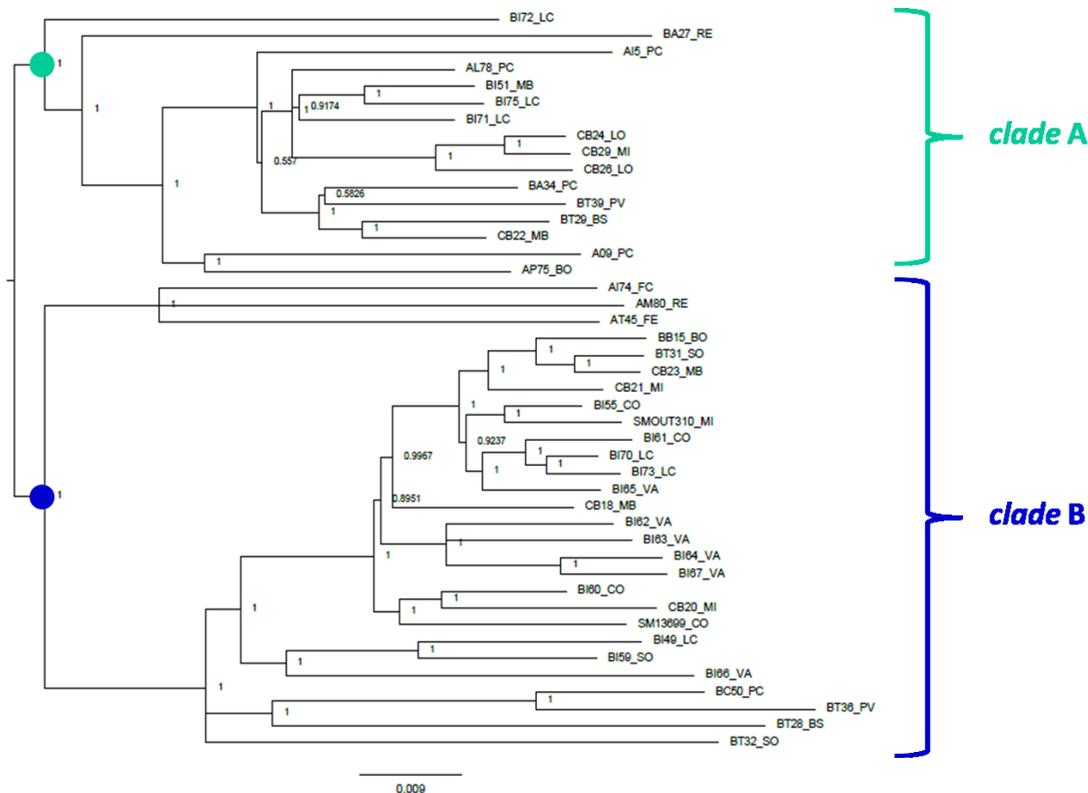


Figura 17. Albero filogenetico ottenuto dall'analisi delle sequenze di *S. Napoli* con il metodo Bayesiano, modello GTR. La lunghezza dei rami è proporzionale al tempo. In corrispondenza dei nodi dei due alberi sono indicati i valori di *posterior probability*.

#### 4.2.4 Analisi filogeografica

Nella Figura 18 è rappresentato l'albero MCC ottenuto con il programma BEAST.



Figura 18. Albero MCC ottenuto dall'analisi delle sequenze di *S. Napoli*. I rami dell'albero sono stati colorati sulla base della localizzazione più probabile dei nodi discendenti: CLV in rosso, ERPV in verde, MMB in azzurro e SOBS in viola.

L'albero mostra la presenza di due *clade* statisticamente significativi: un *clade* include prevalentemente isolati nell'area Sud-Est (*clade A*, probabilità a posteriori,  $p=0,92$ ) e un *clade* che comprende prevalentemente isolati dell'area Nord-Ovest (*clade B*,  $pp=1$ ). Le sequenze isolate nella Città Metropolitana di Milano sono distribuite in entrambi i *clade* e si raggruppano in piccoli *subclade*, che includono non più di 3 sequenze ciascuno.

La stima del tMRCA (*time of Most Recent Common Ancestor*) della radice dell'albero mostra un valore corrispondente a 69 anni (95% HPD 16-165 anni), collocando presumibilmente l'origine delle sequenze in studio al 1945. Nella Tabella 9 sono riportati il tMRCA e la localizzazione più probabile dei *clade* e dei *subclade* identificati.

Tabella 8. tMRCA, date e località di origine dei principali *clade* e *subclade* di S. Napoli.

<b>Nodo</b>	<b>Subclades</b>	<b>tMRCA</b>	<b>Località</b>	<b>pp</b>
<b>Radice</b>		1945	ERPV	0,92
<b>Clade A</b>		1951	ERPV	0,99
	<b>SE1</b>	1964	ERPV	1
	<b>SE2</b>	1962		
	<b>Metro1</b>	1986	ERPV	0,69
<b>Clade B</b>		1959	ERPV	0,77
	<b>NorthWest1</b>	1983	CLV	0,99
	<b>NW2</b>	1971	CLV	0,98
	<b>Metro2</b>	1997	MIMB	0,67

I flussi genetici fra le località in studio, ricostruiti mediante il programma SPREAD, sono riportati in Figura 19. La localizzazione più probabile della radice dell'albero presenta le seguenti coordinate geografiche: 45°12' N (latitudine) e 9°18' E (longitudine), che corrispondono all'area di confluenza del fiume Ticino con il Po, in provincia di Pavia. Da questa zona, S. Napoli si è diffusa simultaneamente in direzione Nord-Ovest e in direzione Sud-Est. La diffusione verso Nord-Ovest segue, apparentemente, il corso dei fiumi Ticino e Adda, fino a raggiungere la Città Metropolitana di Milano nei primi anni '50, per poi espandersi più a Nord, negli anni 2000, e raggiungere la regione dei grandi laghi lombardi. Parallelamente, la diffusione verso Sud-Est segue, apparentemente, il corso del fiume Po, fino a raggiungere Piacenza negli anni '60-'70. Nei tardi anni '80-'90, S. Napoli si diffonde verso Est e, attraverso la Valle del Po, raggiunge Parma, Reggio Emilia e Modena e, negli anni 2000, Bologna. Come si può osservare dalla Figura 19, i rami più esterni raggiungono la provincia di Forlì solo recentemente, nel 2014. Complessivamente, la diffusione del patogeno ha interessato un'area di estensione > 150 km da Nord a Sud e > 250 km da Ovest a Est, con un tasso di diffusione stimato di 2,8 km/anno (*range*: 0,11-5,5).

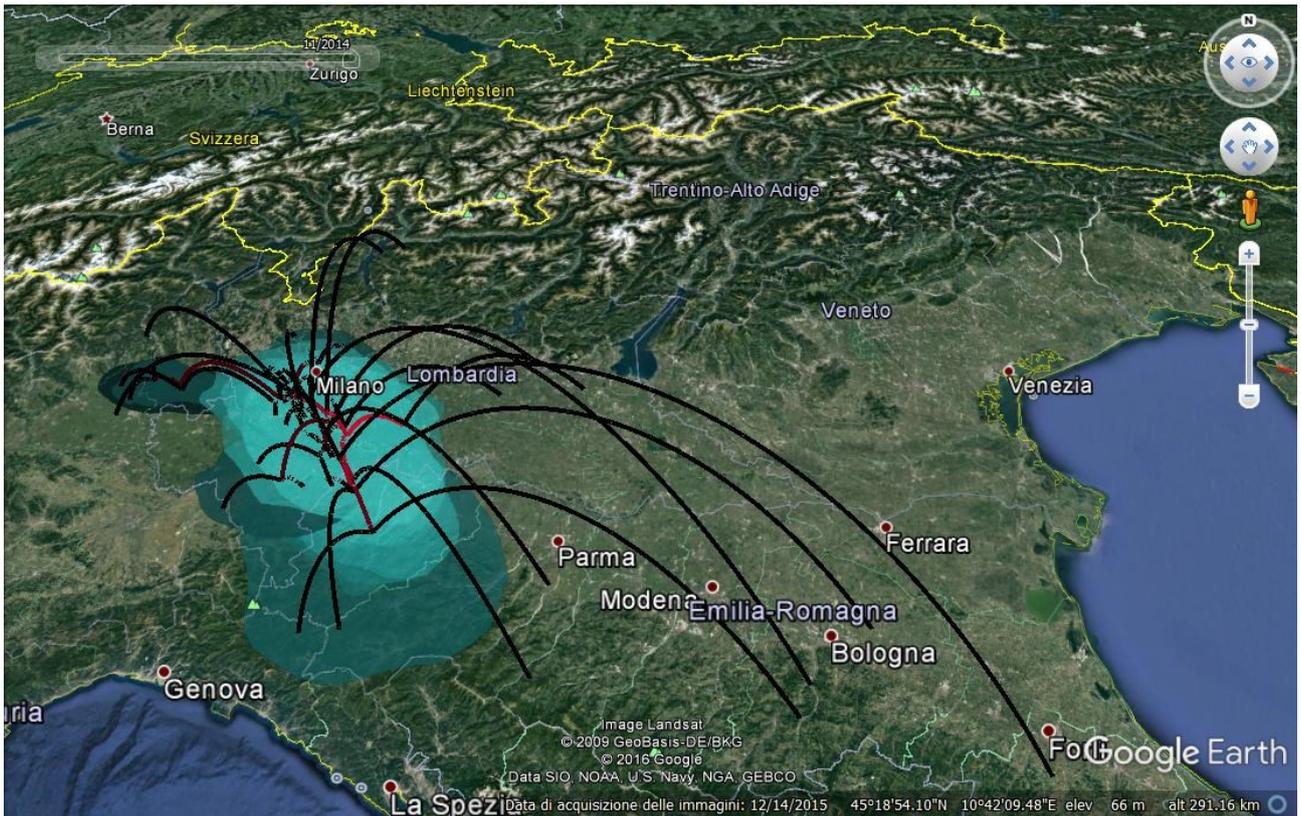


Figura 19. Flussi significativi di migrazione nello spazio di S. Napoli. Sono mostrati i flussi supportati da un *Bayes Factor* (BF) > 3. La ricostruzione spaziale è stata effettuata tramite il programma SPREAD. La mappa è stata prodotta utilizzando un'immagine satellitare ottenuta con Google Earth.

#### 4.2.5 Genomica comparativa

I risultati dell'analisi filogenetica basata sulle analisi dei 93 geni del *core-genoma* selezionati da den Bakker e colleghi [den Bakker HC et al., 2011] sono riportati in Figura 20. L'albero filogenetico generato mostra che il genoma del sierotipo Napoli, ottenuto dal sequenziamento del ceppo responsabile dell'unico evento epidemico riscontrato nel periodo analizzato [Huedo P et al., 2015], è caratterizzato dalla presenza delle isole di patogenicità *cdtB* e *SPI-18* (caratteristica di *S. Typhi* e *S. Paratyphi A* e dei sierotipi del *clade B*) e dalla mancanza dell'operone  $\beta$ -glucuronidasi (caratteristica che accomuna i sierotipi inclusi nel *clade A*). Il quadro genomico che deriva da queste caratteristiche è quello tipico di *S. Typhi* e *S. Paratyphi A*, e colloca *S. Napoli* nel *clade A, subclade Typhi*, con un supporto *bootstrap* del 100%. *S. Paratyphi A* risulta essere il sierotipo maggiormente correlato con *S. Napoli*, con un supporto *bootstrap* pari al 70% [Huedo P et al., 2017].

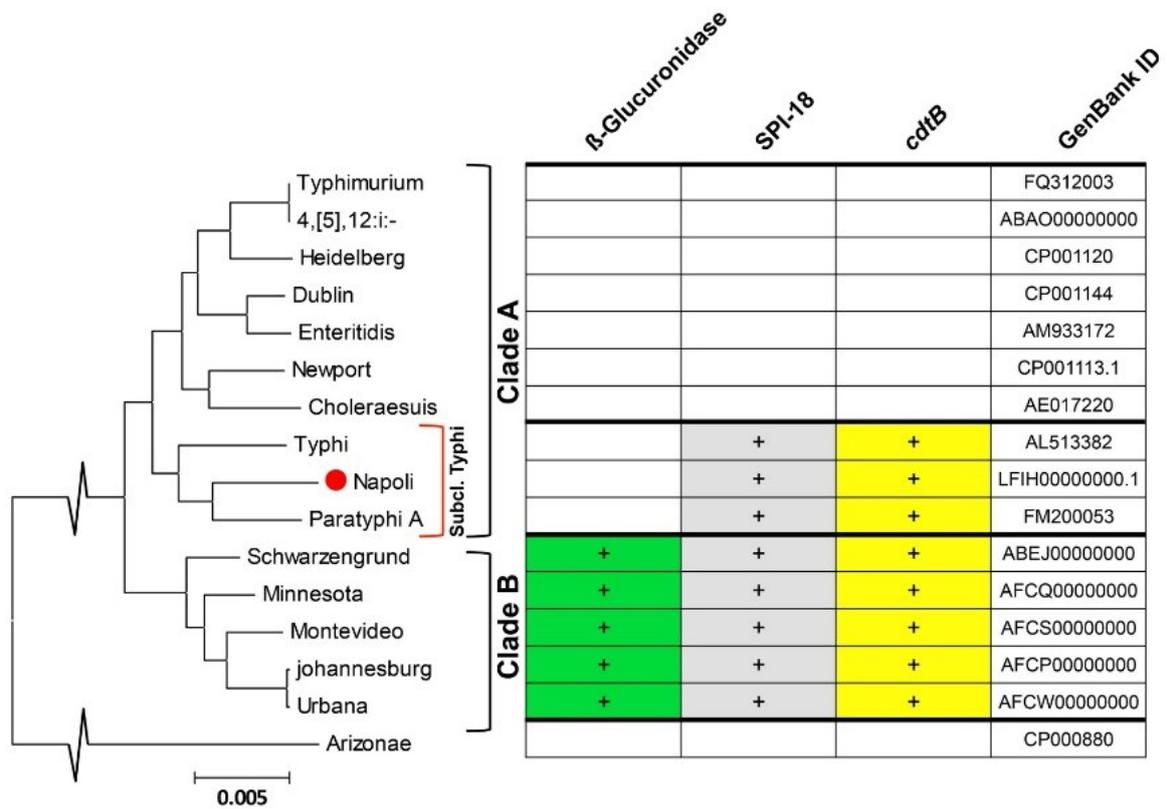


Figura 20. Risultati dell'analisi filogenetica condotta su 93 geni del *core*-genoma di 15 sierotipi di *Salmonella enterica* [den Bakker HC et. al, 2001]. Il sierotipo *S. enterica* subsp. *Arizonae* è stato usato come *outgroup*.

## 5. DISCUSSIONE

La diffusione del sierotipo Napoli nel nostro Paese riguarda un fenomeno multinazionale che coinvolge anche Francia e Svizzera [Fisher IS et al., 2009]. Dal punto di vista epidemiologico, i nostri dati mostrano che i casi di infezione da *S. Napoli* rappresentano il 6,8% di tutte le salmonellosi identificate in Lombardia nel periodo 2010-2016 (885/12962). Questo valore è inferiore a quello riferito Fisher e colleghi per i tre Paesi più interessati da tale sierotipo nel periodo 2000-2006 (18,3%), su cui pesa il dato francese (539 casi) che, tuttavia, non comprende eventi epidemici significativi. Nel periodo analizzato da Fisher et al., viene segnalato, infatti, solamente un piccolo focolaio familiare [Fisher IS et al., 2009]. La percentuale riportata da Graziani et al. per il periodo 2000-2013, su scala nazionale, è pari al 2,3% [Graziani C et al., 2015]. Un aspetto da non sottovalutare è che nella nostra casistica è incluso un evento epidemico di modeste dimensioni, che ha riguardato 47 casi, nel 2014 [Huedo P et al., 2016].

*S. Napoli* si presenta, in alcuni casi, come un sierotipo clinicamente aggressivo, che può dar luogo a casi di salmonellosi invasiva. Dai risultati ottenuti nel presente studio, è emerso che *S. Napoli* è stata isolata da sangue, tipologia di campione solitamente associato ad una patologia invasiva, nel 5,6% dei casi, valore in linea con quelli notoriamente riferiti alle salmonellosi non tifoidee [Gal-Mor O et al., 2014]. Tuttavia, analizzando i dati ottenuti da Enter-Net Italia relativi ai 5 sierotipi più frequentemente isolati in Lombardia per il periodo in studio, è emerso che *S. Napoli* è risultata responsabile del maggior numero di casi di salmonellosi invasiva: la percentuale di casi invasivi determinati da questo sierotipo è pari a più del doppio rispetto agli indici osservati per gli altri sierotipi (Tabella 9).

Tabella 9. Casi totali e casi invasivi dei 5 sierotipi più frequentemente isolati in Lombardia (2010-2016).

Sierotipo	N° casi	N° casi invasivi (%)
4,[5],12:i:-	4354	47 (1,1)
Typhimurium	3017	35 (1,2)
Enteritidis	1140	30 (2,6)
Napoli	885	50 (5,6)
Derby	420	5 (1,2)

Per quanto riguarda le classi di età, i nostri dati confermano quanto riportato in letteratura [Fisher IS et al., 2009; Graziani C et al., 2013; Graziani C et al., 2015], con un maggiore coinvolgimento dei bambini di età compresa tra 0 e 5 anni (433/885: 48,9%), e molti casi tra i bambini con età < 1 anno (62/885: 7%). Questo aspetto può essere dovuto a differenti modalità di esposizione: per i bambini con età < 1 anno, infatti, l'esposizione di tipo *foodborne* può avere un ruolo meno importante [David JM et al., 2014; Graziani C et al., 2015]. La maggiore prevalenza di infezione da *S. Napoli* in questa fascia d'età potrebbe essere dovuta, in aggiunta, alla maggiore propensione da parte dei medici ad

eseguire accertamenti sui bambini più piccoli, data anche la gravità della sintomatologia associata al sierotipo Napoli, caratterizzata spesso da stati febbrili [Pontello M et al., 1984; Oggioni C et al., 2010].

Le differenze di distribuzione per sesso per i casi di *S. Napoli*, come per tutte le salmonellosi non tifoidee, non risultano significative [Graziani C et al., 2013].

Per quanto riguarda la distribuzione geografica e temporale dei casi, i nostri risultati presentano analogie con quanto osservato da Fisher e colleghi. I dati francesi e i dati italiani mostrano una distribuzione non omogenea dei casi: in Francia la zona più colpita è quella occidentale, mentre in Italia, il Nord risulta l'area più interessata [Fisher IS et al., 2009]. I risultati ottenuti nel presente lavoro di tesi evidenziano, inoltre, che nemmeno in Lombardia vi è una distribuzione omogenea dei casi, con tassi di incidenza più elevati nelle province di Como, Lecco, e Varese, situate in prossimità dei confini svizzeri e caratterizzate dalla presenza dei laghi prealpini, le cui acque superficiali avrebbero un ruolo importante nella catena di contagio. Infatti, l'infezione da *S. Napoli*, in base a quanto riportato da altri autori, sarebbe più frequentemente *waterborne* che *foodborne* [Oggioni C et al., 2010; Graziani C et al., 2011].

La distribuzione temporale dei casi di *S. Napoli* mostra una netta stagionalità estiva, che non ha equivalenti con altri sierotipi agenti di salmonellosi non tifoidee, mostrando una forte concentrazione dei casi nei mesi estivi [Graziani C et al., 2013], periodo in cui si svolgono maggiormente attività ludiche e sportive in prossimità dei bacini lacustri. I nostri risultati confermano questo andamento, mostrando una forte concentrazione dei casi tra giugno e ottobre, per tutti gli anni considerati. Diversi studi ipotizzano che l'aumento dell'incidenza dei casi di *S. Napoli* in estate possa essere correlata con l'esistenza di un serbatoio animale (uccelli acquatici, anfibi, ecc...) che durante i mesi più caldi esce dal letargo, o che si trovi ad essere presente nel territorio lombardo durante tali mesi a causa delle abitudini migratorie, contaminando le acque superficiali [Mancini L, 2014; Graziani C et al., 2013]. I dati sulla prevalenza dell'infezione negli animali è, tuttavia, ancora limitata. Parimenti anche l'esposizione al contagio per l'uomo potrebbe verificarsi con una periodicità stagionale, in occasione dello svolgimento di attività ludico-ricreative più frequente durante i mesi estivi (pesca, canottaggio, soggiorno in campeggio sulla riva di fiumi e laghi, ecc...), come osservato da Oggioni e colleghi [Oggioni C et al., 2010].

Per quanto riguarda la distribuzione temporale, i casi di infezione da *S. Napoli* osservati tra il 2014 ed il 2016 hanno subito un consistente declino. L'elevato numero dei casi nel 2014 (179 con incidenza regionale di 1,79 per 100.000 abitanti) è influenzato dall'insorgenza dell'evento

epidemico, ufficialmente riconosciuto, che in quell'anno, tra i mesi di ottobre e novembre, ha riguardato quattro scuole primarie in provincia di Milano. L'inchiesta epidemiologica non aveva permesso di identificare con certezza il veicolo del contagio, anche se si era sospettato fosse coinvolto il consumo di prosciutto cotto. Anche sottraendo i casi appartenenti al focolaio, probabilmente attribuibili ad un'unica fonte, i casi dovuti a S. Napoli risultano comunque in lieve calo tra il 2014 ed il 2016, pari al 47,7%. Riteniamo di poter escludere che tale riduzione dell'incidenza annuale delle infezioni da S. Napoli sia frutto di una ridotta sensibilità del sistema di sorveglianza. Infatti, nello stesso triennio, è stata osservata una riduzione più modesta (-25% circa) dei casi di salmonellosi dovuti a sierotipi diversi da S. Napoli.

Un aspetto interessante riguarda la strettissima vicinanza tra la località dove si è verificato questo *outbreak* e quella dove, nel lontano 1982, è stato prodotto l'alimento veicolo del contagio dell'evento epidemico internazionale. Si potrebbe ipotizzare la presenza di una nicchia ecologica selvatica in questa zona, in grado di contaminare i fiumi Seveso e Olona, che scorrono nei pressi delle aree geografiche interessate dai due eventi epidemici, frequentemente soggetti ad episodi di esondazione.

È possibile osservare un picco di casi anche nell'anno 2013, in corrispondenza del mese di agosto, che suggerisce l'esistenza di un focolaio non identificato dai sistemi di sorveglianza.

La questione della ricostruzione delle catene di contagio per questa infezione resta un enigma. Dagli studi presenti in letteratura appare evidente che la via di trasmissione alimentare sembra non essere frequentemente implicata [Fisher IS et al., 2009; Oggioni C et al., 2010; Graziani C et al., 2015]. Fisher e colleghi hanno riscontrato, in Francia, la presenza di S. Napoli in alcuni prodotti derivati dal pollame, che sono stati distribuiti a livello nazionale, senza tuttavia dare luogo ad alcun focolaio epidemico [Fisher IS et al., 2009]. Questo dato avvalorava l'ipotesi secondo cui la trasmissione *foodborne* non sembra essere la via di trasmissione più frequente.

Non si può nemmeno trascurare il fatto che le infezioni da S. Napoli sembrano assolutamente rare in altre regioni italiane e in altri Paesi europei [Fisher IS et al., 2009; Graziani C et al., 2013]. La diversa diffusione delle infezioni da S. Napoli nelle diverse regioni italiane rappresenta un altro elemento da tenere in considerazione per spiegare l'enigma rappresentato da questo sierotipo. Tali differenze potrebbero essere attribuite ad una reale diversa esposizione alle fonti e veicoli di contagio e non ad una minore sensibilità dei sistemi di sorveglianza nelle altre regioni, dal momento che la capacità di rilevare le infezioni da *Salmonella* non dovrebbe essere influenzata dal sierotipo: trattandosi di un sierotipo più virulento della media degli altri sierotipi, sarebbe attesa una maggior

sensibilità nel riscontro dei casi rispetto a quelli dovuti ad altri sierotipi. Un'altra significativa differenza che può essere notata tra la nostra regione e i Paesi europei riguarda la collocazione di *S. Napoli* in rapporto agli altri sierotipi, *S. Enteritidis* in particolare. Tale sierotipo, notoriamente associato al consumo di uova [Braden CR, 2006], risulta infatti ancora nettamente dominante in Europa (18% delle salmonelle isolate), mentre in Lombardia, rappresentando circa il 5%, viene rilevato con una frequenza simile o anche inferiore a quella del sierotipo *Napoli* [Huedo P et al., 2017]. I due sierotipi sono classificati, secondo lo schema di Kaufmann, nello stesso sierogruppo (O:9), a cui appartengono anche i sierotipi *S. Gallinarum* e *S. Pullorum*, particolarmente adattati al pollame. Si può ipotizzare che, come *S. Enteritidis* ha occupato la nicchia ecologica tipica di *S. Gallinarum* e *S. Pullorum*, nei confronti del quale il pollame era stato vaccinato, così *S. Napoli* potrebbe subentrare a *S. Enteritidis* come conseguenza della vaccinazione sistematicamente effettuata nei confronti di quest'ultimo sierotipo. Possiamo anche segnalare che Fisher, avendo studiato un *cluster* di casi verificatosi in Normandia, aveva ipotizzato che il contagio fosse attribuibile alle uova, ipotesi successivamente scartata, in seguito ai risultati ottenuti attraverso un'indagine epidemiologica; tuttavia, potrebbe essere un altro indizio non trascurabile [Fisher IS et al., 2009].

La caratterizzazione molecolare degli isolati di *S. Napoli*, condotta mediante PFGE, ha rappresentato il secondo obiettivo del presente lavoro di tesi. I risultati delle prove di tipizzazione, condotte su 104 stipiti, hanno mostrato un'eterogeneità dei profili molecolari, avendo identificato 67 diversi pulsotipi *XbaI*. Negli 8 *cluster* individuati, sono compresi complessivamente 30 stipiti (28,8%). Il nostro dato conferma quanto già riportato in letteratura [Fisher IS Et al., 2009; Graziani C et al., 2011] e avvalorare l'ipotesi che la circolazione di *S. Napoli* in Lombardia, pur presentando un andamento apparentemente epidemico nei mesi estivi, in realtà sia riconducibile ad una situazione endemica, sostenuta dalla contemporanea circolazione di diversi "tipi" di *S. Napoli*. L'eterogeneità osservata è in linea con l'elevato potere discriminante della PFGE nella tipizzazione molecolare della maggior parte dei sierotipi di *Salmonella*, che rappresenta il principale vantaggio di questa metodica, come ampiamente riportato in letteratura [Graziani C et al., 2011; Ribot EM et al., 2006]. La PFGE è ancora oggi considerata la tecnica *gold standard* utilizzata dai laboratori di Sanità Pubblica per la sorveglianza delle malattie a trasmissione alimentare, incluse le infezioni da *Salmonella*. Tuttavia, alcuni studi riferiscono che per alcuni sierotipi (come *S. Enteritidis*), la PFGE presenta un limitato potere discriminante [Zheng J et al., 2007]. In aggiunta, come già affermato in precedenza, questa metodica presenta notevoli svantaggi, tra i quali le difficoltà nel confrontare i risultati tra

diversi laboratori e nell'interpretazione dei risultati, durante la quale bisogna tenere conto di tre aspetti fondamentali [Barrett TJ et al., 2006; Tenover FC et al., 1995]:

- la qualità del gel utilizzato per effettuare la corsa elettroforetica; un gel che include digestioni parziali, artefatti o in cui le bande non sono marcate e ben chiare, dovrebbe essere fatto ricorrere, senza provare ad interpretare i risultati ottenuti;
- la diversità del microrganismo testato, in quanto un lieve cambiamento del profilo in una popolazione molto omogenea è probabilmente più significativo rispetto a quello che si verifica in una popolazione eterogenea;
- le informazioni temporali e geografiche relative all'evento epidemico: il tempo, infatti, è uno dei fattori critici nell'interpretazione dei risultati di tipizzazione e nelle epidemie di breve durata, il breve tempo impedisce il verificarsi di mutazioni e pertanto di determinare un *pattern* diverso. Nel caso di epidemie caratterizzate da un periodo di tempo prolungato, i ceppi tendono a trasmettersi da un ospite infetto ad un altro, determinando una maggior probabilità di mutazioni e quindi un cambiamento del profilo molecolare di PFGE.

Inoltre, dal momento che nessuna metodica di tipizzazione ad oggi disponibile fornisce, singolarmente, informazioni esaustive, spesso è opportuno ricorrere a più tecniche, in parallelo [Sammarco ML et al., 2014; Wattiau P et al., 2011]. Per tutte queste ragioni, si è scelto di affiancare alla tipizzazione di *S. Napoli* mediante PFGE quella mediante MLST, metodica che viene ampiamente utilizzata a livello internazionale per gli studi di epidemiologia molecolare su diversi patogeni, inclusi *E. coli* [Wirth T et al., 2006], *Listeria monocytogenes* [Ragon M et al., 2008] e alcuni dei più importanti sierotipi di *Salmonella enterica* responsabili di malattia nell'uomo (ad esempio, *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis* e *S. Dublin*), per confrontare le potenzialità discriminatorie. Kotetishvili e colleghi riferiscono che il MLST è più discriminante, rispetto alla PFGE, per la tipizzazione molecolare di *Salmonella* spp., in quanto è in grado di rilevare tutte le variazioni genetiche all'interno del frammento genico amplificato, mentre la PFGE esamina solo le variazioni all'interno dei siti di clivaggio dell'enzima di restrizione utilizzato [Kotetishvili M et al., 2002].

In letteratura, tuttavia, sono presenti anche studi che affermano che il MLST abbia un basso potere discriminante nella tipizzazione di alcuni sierotipi di *Salmonella enterica*: questo spiegherebbe l'appartenenza della totalità degli stipiti analizzati nel presente studio, isolati in anni e province differenti, ad uno stesso ST. Noda e colleghi [Noda T et al., 2011] riportano che 30 stipiti di *S. Enteritidis* isolati da casi umani, ambientali, alimentari e animali verificatisi in Giappone tra il 1973 e il 2004 sono risultati tutti appartenenti al ST11, ipotizzando che questo risultato sia dovuto al fatto

che il MLST ha un potere discriminante più basso in confronto ad altre metodiche, come ad esempio la PFGE. Anche altri studi condotti su diversi sierotipi di *S. enterica* riferiscono un basso potere discriminante della metodica e ritengono sia preferibile ricorrere alla PFGE, per la tipizzazione molecolare di *Salmonella* spp [Sukhnanand S et al., 2005; Torpdahl, M et al., 2005; Fakhr MK et al., 2005].

Nel nostro studio, i risultati ottenuti dalla tipizzazione mediante MLST hanno mostrato che tutti i 47 isolati analizzati appartengono al ST474, uno dei 9 ST associati a *S. Napoli* presenti nel *Salmonella enterica* MLST database (<http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Senterica>). La nostra ipotesi è che il MLST abbia un basso potere discriminante per la tipizzazione del sierotipo Napoli (così come di altri sierotipi di *S. enterica*), e i risultati ottenuti non hanno contribuito a chiarire il *pattern* di diffusione del sierotipo. In letteratura, attualmente, è presente un solo lavoro, pubblicato di recente, che riferisce dati relativi alla tipizzazione del sierotipo Napoli mediante MLST [Dotto G et al., 2017]. Tutti gli stipiti analizzati nel suddetto lavoro, isolati da cani ospitati in canili, risultano appartenere al medesimo ST (ST1853). Gli autori ipotizzano che l'appartenenza allo stesso ST sia riconducibile all'abilità del patogeno a persistere nell'ambiente e diffondersi facilmente, in modo particolare nei luoghi ad in cui la densità di animali è elevata, come appunto i canili, dove si può riscontrare un unico clone epidemico. L'ipotesi formulata da Dotto e colleghi per spiegare l'appartenenza di tutti gli stipiti al medesimo ST non è applicabile ai risultati ottenuti nel presente lavoro, che ha previsto l'analisi mediante MLST di stipiti provenienti da diverse aree geografiche e isolate in un periodo di tempo equivalente a 7 anni.

Le metodiche molecolari sopracitate sono state sviluppate prima dell'emergere delle tecnologie di NGS, e presentano alcune limitazioni comuni, come l'incompleta rilevazione di variazioni genomiche che esistono tra diversi ceppi che causano eventi epidemici. Il sequenziamento dell'intero genoma offre ovvi vantaggi per la subtipizzazione di batteri patogeni, avendo la capacità di valutare l'intero genoma batterico.

Nel presente lavoro di tesi, l'analisi filogenetica è stata utilizzata come strumento per apportare un contributo alla conoscenza del *pattern* di diffusione spazio-temporale di questo enigmatico sierotipo, così come definito da Fisher e colleghi [Fisher IS et al., 2009]. I risultati delle analisi di filogeografia suggeriscono che *S. Napoli* abbia avuto origine in provincia di Pavia, intorno al 1945, anno che coincide con il primo isolamento, avvenuto a Napoli, da un portatore addetto a una mensa militare americana [Bruner DW and Edwards PR, 1945]. Da questa zona, il patogeno si sarebbe diffuso attraverso due direzioni principali: verso Nord-Ovest, raggiungendo prima Milano, negli anni

'50, e poi la regione dei grandi laghi lombardi, negli anni 2000, e verso Sud-Est, raggiungendo Piacenza e successivamente Bologna. Dal momento del suo primo isolamento, avvenuto, come riferito precedentemente, nel 1945, *S. Napoli* non ha più suscitato l'interesse degli epidemiologi fino al 1982, quando ha causato un'epidemia che ha coinvolto 245 casi in Inghilterra e Galles [Gill ON et al., 1983], correlata al consumo di barrette di cioccolato prodotte in Italia, in provincia di Milano. Tale evento è insorto nel periodo immediatamente successivo all'intervallo di tempo in cui si sarebbe originato e quindi diffuso il *clade* Nord-Ovest. Purtroppo, pur avendo consultato l'Istituto Superiore di Sanità, il ceppo caratterizzante l'epidemia non è oggi più disponibile per verificarne l'eventuale appartenenza al *clade*. Nel medesimo anno, si è verificato, inoltre, un incremento degli isolamenti di *S. Napoli* nel Nord Italia, in modo particolare in Lombardia, che è risultato il terzo sierotipo in ordine di frequenza (12,2% del totale degli isolamenti di *Salmonella* spp.) [Pontello M et al., 1984]. Successivamente, nel 1986, il sierotipo Napoli torna ad essere oggetto di attenzione da parte degli epidemiologi, essendo responsabile di un altro evento epidemico in provincia di Brescia, legato presumibilmente al consumo di carne equina [Costa E et al., 1987]. Negli anni 2000, secondo la ricostruzione filogeografica, *S. Napoli* raggiunge i principali laghi lombardi, periodo che coincide sia con l'aumento dei casi in Lombardia [Graziani C et al., 2015] che con la segnalazione di un elevato numero di casi in Svizzera, nel Canton Ticino [Fisher IS et al., 2009]. La diffusione, che segue il corso dei fiumi Ticino, Adda e Po, è coerente con l'ipotesi secondo la quale le acque superficiali potrebbero essere responsabili dell'esposizione al contagio per l'uomo, per contatto diretto o attraverso la filiera alimentare. Considerato che le acque superficiali non potrebbero favorire la moltiplicazione microbica del sierotipo Napoli ed il raggiungimento di elevate cariche microbiche, dobbiamo presumere che l'infezione si verifichi in seguito all'ingestione di basse cariche batteriche.

Il focolaio epidemico causato da *S. Napoli* nel 2014 ci ha permesso di effettuare ulteriori studi su questo sierotipo e, in particolare, sulla sua invasività [Huedo P et al., 2016; Huedo P et al., 2017]. Le analisi filogenetiche condotte sugli isolati responsabili dell'epidemia hanno mostrato la correlazione tra il sierotipo Napoli e i sierotipi tifoidei e paratifoidei, evidenziando che *S. Napoli* presenta caratteristiche, a livello genomico, che si riteneva fossero esclusive di *S. Typhi* e *S. Paratyphi A* [den Bakker HC et al., 2011]. Questo risultato è coerente con i dati epidemiologici sul sierotipo Napoli presenti in letteratura, che riferiscono una bassa carica batterica infettante sufficiente a causare la patologia (compatibile con la contaminazione delle acque superficiali senza che vi sia moltiplicazione da parte del patogeno), un lungo periodo di incubazione, un quadro clinico severo,

che può manifestarsi con sintomi simil-tifoidei, un elevato tasso di ospedalizzazione e un elevato numero di campioni isolati da sangue.

In conclusione, i nostri dati confermano che *S. Napoli* è un sierotipo di maggior impatto sulla salute dell'uomo rispetto ad altri più comuni sierotipi non tifoidei, e suggeriscono la necessità di chiarire le modalità di contagio, in considerazione dell'interesse che nel nostro Paese, e in particolare nella nostra regione, questo sierotipo atipico tende ad avere per la sua incidenza [Graziani C et al., 2013]. Le linee di indirizzo, soprattutto per individuare le nicchie ecologiche, potrebbero comprendere il monitoraggio della fauna tipica degli ambienti lacustri e, più in generale, delle acque superficiali. Si rende necessario, pertanto, consolidare le analisi filogenetiche e filogeografiche, estendo l'analisi a stipiti provenienti da altre aree geografiche, a livello nazionale e internazionale, sviluppare la ricerca dei fattori di virulenza, studiandone le basi genetiche, sfruttando le tecnologie NGS, ed effettuando un confronto con altri sierotipi, in particolare quelli più aggressivi per l'uomo.

## 6. BIBLIOGRAFIA

Achtman M, Wain J, Weill F-X, Nair S, Zhou Z, Sangal V, Krauland MG, Hale JL, Harbottle H, Uesbeck A, Dougan G, Harrison LH and Brisse S. Multilocus Sequence Typing as a Replacement for Serotyping in *Salmonella enterica*. Bessen DE, ed. PLoS Pathogens. 2012;8(6):e1002776. doi:10.1371/journal.ppat.1002776.

Adley CC and Ryan MP, "The nature and extent of foodborne disease," in Antimicrobial Food Packaging, J. Barros-Velazquez, ´ Ed., chapter 1, pp. 1–10, Academic Press, San Diego, Calif, USA, 2016.

Agbaje M, Begum RH, Oyekunle MA, Ojo OE, Adembi OT (2011) Evolution of *Salmonella* nomenclature: a critical note. Folia Microbiol 56:497–503.

Andersson Y, Hjertqvist M, Löfdahl S. Mera. *Salmonella* och ruccolasallad. Epi-aktuellt 2004: 50.

Ao TT, Feasey NA, Gordon MA, Keddy KH, Angulo FJ, Crump JA. Global Burden of Invasive Nontyphoidal *Salmonella* Disease, 2010. Emerging Infectious Diseases. 2015;21(6):941-949. doi:10.3201/eid2106.140999.

Aserkoff B, Bennett JV. Effect of antibiotic therapy in acute salmonellosis on the fecal excretion of salmonellae. N Engl J Med. 1969 Sep 18;281(12):636–640.

Baele G, Lemey P, Bedford T, Rambaut A, Suchard MA, Alekseyenko AV. Improving the accuracy of demographic and molecular clock model comparison while accommodating phylogenetic uncertainty. Mol Biol Evol. 2012; 29:2157-67

Barrett TJ, Gerner-Smidt P, Swaminathan B. Interpretation of pulsed-field gel electrophoresis patterns in foodborne disease investigations and surveillance. Foodborne Pathog Dis. 2006;3:20–31.

Bäumler AJ, Tsois RM, Valentine PJ, Ficht TA, Heffron F. Synergistic effect of mutations in *invA* and *lpfC* on the ability of *Salmonella typhimurium* to cause murine typhoid. Infection and Immunity. 1997;65(6):2254-2259.

Blaser MJ, Newman LS. A review of human salmonellosis: I. Infective dose. Rev Infect Dis (1982) 4:1096–106.10.1093/clinids/4.6.1096.

- Bruner DW et Edwards PR. Two New *Salmonella* Types Belonging to Somatic Group D. *Experimental Biology and Medicine* Vol 58, Issue 4, pp. 289 – 290. doi: 10.3181/00379727-58-14926.
- Buchwald DS, Blaser MJ. A Review of Human Salmonellosis: II. Duration of Excretion Following Infection with Nontyphi *Salmonella*. *Rev Infect Dis*. 1984;6:345–56. doi: 10.1093/clinids/6.3.345.
- Buckle GC, Walker CL, Black RE. Typhoid fever and paratyphoid fever: systematic review to estimate global morbidity and mortality for 2010. *J Glob Health*. 2012;2:10401.
- Capuano F, Picotto P, De Medici D, De Giusti M, Lena R, Delibato E, Di Pasquale S, Durante G, Mioni R, Losio N, Orefice L, Mancini L, Scenati R, Marcheggiani S, Caponigro V, Luzzi I. Allerta europea e prodotti di origine vegetale: un approccio integrato per supportare la gestione del rischio microbiologico. In: XII Conferenza Nazionale di Sanità Pubblica (SiTi). Atti; 12-15 ottobre 2011; Roma. 2011.
- Carmeni A, Giammanco G and Giacalone F. Isolamenti di Salmonelle dal contenuto intestinale di “*Lacerta muralis*”. *Igiene Moderna* 1968;61:29–34.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). National *Salmonella* Surveillance Annual Report, 2015. Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services, CDC, 2017.
- Chiari M, Zanoni M, Tagliabue S, Lavazza A, Alborali LG. *Salmonella* serotypes in wild boars (*Sus scrofa*) hunted in northern Italy, *Acta Veterinaria Scandinavica* 2013;21:42-5.
- Cianflone NFC. Salmonellosis and the GI Tract: More than Just Peanut Butter. *Current gastroenterology reports*. 2008;10(4):424-431.
- Craven PC, Mackel DC, Baine WB, Barker WH, Gangarosa EJ, International outbreak of *Salmonella* Eastbourne infection traced to contaminated chocolate, *Lancet* 1975;1:788-92.
- Crump JA, Luby SP, Mintz ED. The global burden of typhoid fever. *Bulletin of the World Health Organization*. 2004;82(5):346-353.
- Cummings KJ, Warnick LD, Davis MA, et al. Farm Animal Contact as Risk Factor for Transmission of Bovine-associated *Salmonella* Subtypes. *Emerging Infectious Diseases*. 2012;18(12):1929-1936. doi:10.3201/eid1812.110831.

D'Aoust J. and Maurer J. "*Salmonella* species," in Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers, Doyle M. and Beuchat L., Eds., pp. 187–236, ASM Press, Washington, DC, USA, 3rd edition, 2007.

den Bakker HC, Moreno Switt AI, Govoni G, Cummings CA, Ranieri ML, Degoricija L, et al. Genome sequencing reveals diversification of virulence factor content and possible host adaptation in distinct subpopulations of *Salmonella enterica*. BMC Genomics. 2011;12: 425. doi:10.1186/1471-2164-12-425.

Dionisi AM, Filetici E, Ocuzarek S, et al. Enter-net: sorveglianza delle infezioni trasmesse da alimenti e acqua. Rapporto dell'attività 2007-2009. Not Ist Super Sanità 2011;24:3–10.

Dotto G, Menandro ML, Mondin A, Martini M, Pasotto D. First detection of *Salmonella enterica* serovar Napoli in kennel dogs in Italy. Vet Rec. 2017; vetrec-2016-104094. doi:10.1136/vr.104094.

Drummond AJ, Rambaut A. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. BMC Evolutionary Biology. 2007;7:214. doi:10.1186/1471-2148-7-214.

Dworkin MS, Shoemaker PC, Goldoft MJ, Kobayashi JM. Reactive arthritis and Reiter's syndrome following an outbreak of gastroenteritis caused by *Salmonella* enteritidis. Clin. Infect. Dis. 2001;33:1010–1014.

EFSA (European Food Safety Authority) and ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control), 2015. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2014. EFSA Journal 2015;13(12):4329, 190 pp. doi:10.2903/j.efsa.2015.4329

EFSA BIOHAZ Panel (EFSA Panel on Biological Hazards), 2014. Scientific Opinion on the public health risks of table eggs due to deterioration and development of pathogens. EFSA Journal 2014;12(7):3782, 147 pp. doi:10.2903/j.efsa.2014.3782.

Ehrbar K, Friebel A, Miller SI, Hardt W-D. Role of the *Salmonella* Pathogenicity Island 1 (SPI-1) Protein InvB in Type III Secretion of SopE and SopE2, Two *Salmonella* Effector Proteins Encoded Outside of SPI-1. Journal of Bacteriology. 2003;185(23):6950-6967. doi:10.1128/JB.185.23.6950-6967.2003.

Ewing WH. The nomenclature of *Salmonella*, its usage, and definitions for the three species. Canadian Journal of Microbiology. 1972;18(11):1629–1637. doi: 10.1139/m72-252.

Fakhr MK, Nolan LK, Logue CM. Multilocus Sequence Typing Lacks the Discriminatory Ability of Pulsed-Field Gel Electrophoresis for Typing *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. Journal of Clinical Microbiology. 2005;43(5):2215-2219. doi:10.1128/JCM.43.5.2215-2219.2005.

Feil EJ, Li BC, Aanensen DM, Hanage WP, Spratt BG. eBURST: Inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from Multilocus Sequence Typing data. J Bacteriol. 2004;186:1518–1530.

Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenesis: An approach using the bootstrap. Evolution; 39: 783-791.

Fisher IS, Jourdan-Da Silva N, Hacler H, Weill FX, Schmid H, Danan C, Kérouanton A, Lane CR, Dionisi AM, Luzzi I. Human infections due to *Salmonella* Napoli: a multicountry, emerging enigma recognized by the Enter-net international surveillance network, Foodborne Pathog Dis. 2009;6:613-9.

Gal-Mor O, Boyle EC, Grassl GA. Same species, different diseases: how and why typhoidal and non-typhoidal *Salmonella enterica* serovars differ. Frontiers in Microbiology 2014;5:391.

García-Fernández A, Gallina S, Owczarek S, Dionisi AM, Benedetti I, Decastelli L and Luzzi I. (2015). Emergence of Ciprofloxacin-Resistant *Salmonella enterica* Serovar Typhi in Italy. PLoS ONE, 10(6), e0132065. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0132065>.

Gardner SN and Hall BG. 2013. When whole-genome alignments just won't work: kSNP v2 software for alignment-free SNP discovery and phylogenetics of hundreds of microbial genomes. PLoS One. 8:e81760. doi: 10.1371/journal.pone.0081760.

Gardy JL, Johnston JC, Ho Sui SJ, Cook VJ, Shah L, et al. Whole-genome sequencing and social-network analysis of a tuberculosis outbreak. N Engl J Med. 2011;364:730–739. doi: 10.1056/NEJMoa1003176.

Gibson B. The effect of high sugar concentration on the heat resistance of vegetative micro-organism. J Appl Bacteriol 1973;36:365-376.

Gill ON, Sockett PN, Bartlett CL, Vaile MS, Rowe B, Gilbert RJ, Dulake C, Murrell HC, Salmaso S. Outbreak of *Salmonella* Napoli infection caused by contaminated chocolate bars. *Lancet* 1983;1(8324):574-7.

Gizzarelli S, Salmaso S, Toti L, Zanoni D, Microbiologic investigation of chocolate contaminated with *Salmonella* Napoli, *Nuovi Ann Ig Microbiol* 1983;34:347-52.

Glynn JR, Palmer SR. Incubation period, severity of disease, and infecting dose: evidence from a *Salmonella* outbreak. *Am J Epidemiol.* 1992 Dec 1;136(11):1369–1377.

Gordon MA, *Salmonella* infections in immunocompromised adults. *J. Infect.* 2008;56:413–422.

Graziani C, Busani L, Dionisi AM, Caprioli A, Ivarsson S, Hedenström I, Luzzi I. Virulotyping of *Salmonella enterica* serovar Napoli strains isolated in Italy from human and nonhuman sources, *Foodborne Pathog Dis* 2011, 8:997–1003.

Graziani C, Luzzi I, Owczarek S, Dionisi AM, Busani L. *Salmonella enterica* Serovar Napoli Infection in Italy from 2000 to 2013: Spatial and Spatio-Temporal Analysis of Cases Distribution and the Effect of Human and Animal Density on the Risk of Infection. Hensel M, ed. *PLoS ONE.* 2015;10(11):e0142419. doi:10.1371/journal.pone.0142419.

Graziani C, Mughini-Gras L, Owczarek S, Dionisi A, Luzzi I, Busani L. Distribution of *Salmonella enterica* isolates from human cases in Italy, 1980 to 2011. *Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull* 2013, 18.

Greenwood MH, Hooper WL, Chocolate bar contaminated with *Salmonella* Napoli. An infectivity study. *BMJ* 1983;286:1394.

Grenfell BT, Pybus OG, Gog JR, Wood JL, Daly JM, Mumford JA, et al. Unifying the epidemiological and evolutionary dynamics of pathogens. *Science.* 2004;303(5656):327–32. Epub 2004/01/17 05:00. pmid:14726583.

Grimont PA, Weill FX. Antigenic Formulae of the *Salmonella* Serovars. 9th. Paris, France: WHO Collaborating Center for Reference and Research on *Salmonella*, Institut Pasteur; 2007. <http://www.scacm.org/free/Antigenic%20Formulae%20of%20the%20Salmonella%20Serovars%202007%209th%20edition.pdf>.

Gunn JS, Ernst RK, McCoy AJ, Miller SI. Constitutive Mutations of the *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Transcriptional Virulence Regulator *phoP*. Barbieri JT, ed. Infection and Immunity. 2000;68(6):3758-3762.

Hensel M. Evolution of pathogenicity islands of *Salmonella enterica*. Int J Med Microbiol (2004) 294:95–102.10.1016/j.ijmm.2004.06.025.

Hohmann E. L. (2001). Nontyphoidal salmonellosis. Clin. Infect. Dis. 32 263–269. 10.1086/318457.

Huedo P, Gori M, Scaltriti E, Morganti M, Casadei G, Amato E and Pontello M. Draft Genome Sequence of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Serovar Napoli Strain SN310, Cause of a Multischool Outbreak in Milan, Italy, in 2014. Genome Announc. 2015;3. doi:10.1128/genomeA.01044-15.

Huedo P, Gori M, Amato E, Bianchi R, Valerio E, Magnoli L and Pontello M. A Multischool Outbreak Due to *Salmonella enterica* serovar Napoli Associated with Elevated Rates of Hospitalizations and Bacteremia, Milan, Italy, 2014. Foodborne Pathog Dis. 2016; doi:10.1089/fpd.2015.2091.

Huedo P, Gori M, Zolin A, Amato E, Ciceri G, Bossi A and Pontello M. *Salmonella enterica* Serotype Napoli is the First Cause of Invasive Nontyphoidal Salmonellosis in Lombardy, Italy (2010–2014), and Belongs to Typhi Subclade. Foodborne Pathog Dis. 2016;14: 148–151. doi:10.1089/fpd.2016.2206.

Huehn S, La Ragione RM, Anjum M, Saunders M, Woodward MJ, Bunge C, Helmuth R, Hauser E, Guerra B, Beutlich J, Brisabois A, Peters T, Svensson L, Madajczak G, Litrup E, Imre A, Herrera-Leon S, Mevius D, Newell DG, Malorny B, Virulotyping and antimicrobial resistance typing of *Salmonella enterica* serovars relevant to human health in Europe, Foodborne Pathog Dis 2010;7:523–535.

Issenhuth-Jeanjean S, Roggentin P, Mikoleit M, Guibourdenche M, de Pinna E, Nair S, Fields PI, Weill FX. Supplement 2008-2010 (no. 48) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. Res Microbiol. 2014 Sep;165(7):526-30. PubMed PMID:25049166.

Jones MB, Smith PW, Olmhausen RW. Reiter's syndrome after *Salmonella* infection: occurrence in HLA--B27 positive brothers. Arthritis Rheum. 1979 Oct;22(10):1141–1142.

Kass RE, Raftery AE. 1995. Bayes factors. J Am Stat Assoc 90(430):773–795.

Kauffmann F. The Bacteriology of Enterobacteriaceae. Baltimore, Md, USA: Williams & Wilkins; 1966.

Kaur J, Jain SK. Role of antigens and virulence factors of *Salmonella enterica* serovar Typhi in its pathogenesis. Microbiol Res 2012;167:199–210.

Killalea D, Ward LR, Roberts D, de Louvois J, Sufi F, Stuart JM, Wall PG, Susman M, Schwieger M, Sanderson PJ, Fisher IST, Mead PS, Gill ON, Bartlett CLR, Rowe B. International epidemiological and microbiological study of outbreak of *Salmonella* Agona infection from a ready to eat savoury snack in England and Wales and the United States. BMJ 1996;313:1105-7.

Komitopoulou E and Peñaloza W. Fate of *Salmonella* in dry confectionery raw materials. Journal of Applied Microbiology 2009;106:1892–1900.

Kotetishvili M, Stine OC, Kreger A, Morris, Jr. JG, Sulakvelidze A. Multilocus Sequence Typing for Characterization of Clinical and Environmental *Salmonella* Strains. Journal of Clinical Microbiology. 2002;40(5):1626-1635. doi:10.1128/JCM.40.5.1626-1635.2002.

Le Minor L, Popoff MY. Designation of *Salmonella enterica* sp. nov., nom. rev., as the type and only species of the genus *Salmonella*: request for an opinion. International Journal of Systematic Bacteriology. 1987;37:465–468.

Lemarchand K, Lebaron P. Influence of mutation frequency on the persistence of *Salmonella enterica* serotypes in natural waters. FEMS Microbiol Ecol 2002;41:125-31.

Lemey P, Rambaut A, Welch JJ, Suchard MA. Phylogeography Takes a Relaxed Random Walk in Continuous Space and Time. Molecular Biology and Evolution. 2010;27(8):1877-1885. doi:10.1093/molbev/msq067.

Lemey P, Suchard M, Rambaut A. Reconstructing the initial global spread of a human influenza pandemic: A Bayesian spatial-temporal model for the global spread of H1N1pdm. PLoS Curr. 2009;1(1):RRN1031. Epub 2009/12/24 06:00. pmid:20029613.

Maclennan CA. Out of Africa: links between invasive non typhoidal *Salmonella* disease, typhoid fever, and malaria. Clin. Infect.Dis.Off.Publ.Infect. Dis.Soc.Am. 2014;58:648–650.

- Majowicz SE, Musto J, Scallan E, Angulo FJ, Kirk M, O'Brien SJ, et al. The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis. *Clin Infect Dis* (2010) 50:882–9. [10.1086/650733](https://doi.org/10.1086/650733)
- Mancini L. First isolation of *Salmonella enterica* serovar Napoli from wild birds in Italy, *Ann Ist Super Sanità* 2014;Vol. 50(1): 96-98.
- McGovern VJ, Slavutin LJ. Pathology of *Salmonella* colitis. *Am. J. Surg. Pathol.* 1979;3:483–490.
- Melloul AA, Hassani L, Rafouk L. *Salmonella* contamination of vegetables irrigated with untreated wastewater. *World J Microbiol & Biotech* 2001;17:207-9.
- Mizuno Y, Takada H, Nomura A, Jin CH, Hattori H, Ihara K, Aoki T, Eguchi K and Hara T. Th1 and Th1-inducing cytokines in *Salmonella* infection. *Clin Exp Immunol* (2003) 131(1):111–7. [10.1046/j.1365-2249.2003.02060.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-2249.2003.02060.x).
- Murase T, Yamada M, Muto T, Matsushima A, Yamai S. Fecal Excretion of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Following a Food-Borne Outbreak. *Journal of Clinical Microbiology.* 2000;38(9):3495-3497.
- Nguyen QC, Everest P, Tran TK, House D, Murch S, Parry C, Connerton P, Phan VB, To SD, Mastroeni P, White NJ, Tran TH, Vo VH, Dougan G, Farrar JJ, Wain J. A clinical, microbiological, and pathological study of intestinal perforation associated with typhoid fever. *Clin Infect Dis.* 2004;39:61–67.
- Noda T, Murakami K, Asai T, Etoh Y, Ishihara T, Horikawa K and Fujimoto S. Multi-locus sequence typing of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis strains in Japan between 1973 and 2004. *Acta Veterinaria Scandinavica.* 2011;53(1):38. [doi:10.1186/1751-0147-53-38](https://doi.org/10.1186/1751-0147-53-38).
- O'Mahoney M, Cowden J, Smyth B, Lynch D, Hall M, Rowe B, Teare EL, Tettmar RE, Rampling AM, Coles M, Gilbert RJ, Kingcott E, Bartlett CLR. An outbreak of *Salmonella* Saintpaul infection associated with bean sprouts. *Epidemiology and Infection* 1990;104:229-35.
- Oggioni C, Fontana G, Pavan A, Gramegna M, Ferretti V, Piatti A, Sala G, Pontello M. Identificazione di potenziali fattori di rischio per i casi di infezione da *Salmonella enterica* subsp *enterica* sierotipo Napoli attraverso uno studio caso-controllo nidificato condotto in Regione Lombardia, *Ann Igiene* 2010;22:327-335.

Pontello M, Gualterotti S, Belloni A. Inatteso incremento di *Salmonella* Napoli nel 1982: aspetti clinici ed epidemiologici, Mal. Inf. Parass. 1984;36: 814.

Ragon M, Wirth T, Hollandt F, Lavenir R, Lecuit M, Le Monnier A and Brisse S. A New Perspective on *Listeria monocytogenes* Evolution. Dykhuizen D, ed. PLoS Pathogens. 2008;4(9):e1000146. doi:10.1371/journal.ppat.1000146.

Rizzo G, De Vito D. Typhoid fever and environmental contamination in Apulia Region, Italy. Ann Ig. 2003;15:487–92.

Ronquist F, van der Mark P, Huelsenbeck JP. Bayesian phylogenetic analysis using MrBayes. Theory in Lemey P. Salemi M. Vandamme A.M., The phylogenetic handbook: A practical approach to phylogenetic analysis and hypothesis testing, seconda edizione. Cambridge University Press, 2009, 210-236.

Ryan MP, O'Dwyer J, Adley CC. Evaluation of the Complex Nomenclature of the Clinically and Veterinary Significant Pathogen *Salmonella*. BioMed Research International. 2017;2017:3782182. doi:10.1155/2017/3782182.

Sabat AJ, Budimir A, Nashev D, Sá-Leão R, van Dijk JM, Laurent F, Grundmann H, Friedrich AW. Overview of molecular typing methods for outbreak detection and epidemiological surveillance. Eur. Surveill. 2013;18(4):20380–20395.

Sabbagh SC, Forest CG, Lepage C, Leclerc JM and Daigle F (2010). So similar, yet so different: uncovering distinctive features in the genomes of *Salmonella enterica* serovars Typhimurium and Typhi. FEMS Microbiol. Lett. 305, 1–13. doi: 10.1111/j.1574-6968.2010.01904.x.

Salmon D, Smith T. US Bureau of Animal Industries. 2nd Annual Report. 184. Washington, DC, USA: U.S. Government Printing Office; 1885. Report on swine plague.

Sammarco ML, Ripabelli G and Tamburro M. Molecular epidemiology of infectious diseases: analytical methods and results interpretation. Ann Ig 2014; 26: 10-45 doi:10.7416/ai.2014.1956.

Scaltriti E, Sassera D, Comandatore F, Morganti M, Mandalari C, Gaiarsa S, Bandi C, Zehender G, Bolzoni L, Casadei G and Pongolini S. Differential Single Nucleotide Polymorphism-Based Analysis of an Outbreak Caused by *Salmonella enterica* Serovar Manhattan Reveals Epidemiological Details

Missed by Standard Pulsed-Field Gel Electrophoresis. Diekema DJ, ed. *Journal of Clinical Microbiology*. 2015;53(4):1227-1238. doi:10.1128/JCM.02930-14.

Shelobolina ES, Sullivan SA, O'Neill KR, Nevin KP, Lovley DR. Isolation, Characterization, and U(VI)-Reducing Potential of a Facultatively Anaerobic, Acid-Resistant Bacterium from Low-pH, Nitrate- and U(VI)-Contaminated Subsurface Sediment and Description of *Salmonella subterranea* sp. nov. *Applied and Environmental Microbiology*. 2004;70(5):2959-2965. doi:10.1128/AEM.70.5.2959-2965.2004.

Silva C, Calva E, Maloy S. 2014. One health and food-borne disease: *Salmonella* transmission between humans, animals, and plants. *Microbiol Spectr* 2:e01212-16. doi:10.1128/microbiolspec.OH-0020-2013.

Steele-Mortimer O. The *Salmonella*-containing Vacuole – Moving with the Times. *Current opinion in microbiology*. 2008;11(1):38-45. doi:10.1016/j.mib.2008.01.002.

Stoycheva M, Murdjeva M. Serum levels of interferon-gamma, interleukin-12, tumour necrosis factor-alpha, and interleukin-10, and bacterial clearance in patients with gastroenteric *Salmonella* infection. *Scandinavian journal of infectious diseases*. 2005;37(1):11–4.

Struelens MJ. Consensus guidelines for appropriate use and evaluation of microbial epidemiologic typing systems. *Clin. Microbiol. Infect.* 1996;2:2–11. doi: 10.1111/j.1469-0691.1996.tb00193.x.

Su LH, Chiu CH. *Salmonella*: clinical importance and evolution of nomenclature. *Chang Gung Med J*. 2007;30:210–9.

Sukhnanand S, Alcaine S, Warnick LD, Su WL, Craver MPJ, McDonough P, Boor KJ and Wiedmann M. DNA Sequence-Based Subtyping and Evolutionary Analysis of Selected *Salmonella enterica* Serotypes. *Journal of Clinical Microbiology*. 2005;43(8):3688-3698. doi:10.1128/JCM.43.8.3688-3698.2005.

Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: Criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.* 1995;33:2233–2239.

Torpdahl M, Skov MN, Sandvang D, Baggesen DL. Genotypic characterization of *Salmonella* by multilocus sequence typing, pulsed-field gel electrophoresis and amplified fragment length polymorphism. *J Microbiol Methods*. 2005;63:173–184. doi: 10.1016/j.mimet.2005.03.006.

Uche IV, MacLennan CA, Saul A. A Systematic Review of the Incidence, Risk Factors and Case Fatality Rates of Invasive Nontyphoidal *Salmonella* (iNTS) Disease in Africa (1966 to 2014). Baker S, ed. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2017;11(1):e0005118. doi:10.1371/journal.pntd.0005118.

Van Belkum A, Tassios PT, Dijkshoorn L, Haeggman S, Cookson B, Fry NK, Fussing V, Green J, Feil E, Gerner-Smidt P, Brisse S, Struelens MJ. Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. *Clin. Microbiol. Infect.* 2007;13(Suppl. 3):1–46. doi: 10.1111/j.1469-0691.2007.01786.x.

Van de Vosse E, Ottenhoff TH. Human host genetic factors in mycobacterial and *Salmonella* infection: lessons from single gene disorders in IL-12 / IL-23 dependent signaling that affect innate and adaptive immunity. *Microbes Infect.* 2006;8:1167–1173.

Velge P, Wiedemann A, Rosselin M, et al. Multiplicity of *Salmonella* entry mechanisms, a new paradigm for *Salmonella* pathogenesis. *MicrobiologyOpen*. 2012;1(3):243-258. doi:10.1002/mbo3.28.

Wattiau P, Boland C, Bertrand S. Methodologies for *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Subtyping: Gold Standards and Alternatives. *Applied and Environmental Microbiology*. 2011;77(22):7877-7885. doi:10.1128/AEM.05527-11.

Whiley H, Ross K. *Salmonella* and Eggs: From Production to Plate. Tchounwou PB, ed. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2015;12(3):2543-2556. doi:10.3390/ijerph120302543.

Wirth T, Falush D, Lan R, Colles F, Mensa P, Wieler LH, Karch H, Reeves PR, Maiden MCJ, Ochman H and Achtman M. Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective. *Molecular Microbiology*. 2006;60(5):1136-1151. doi:10.1111/j.1365-2958.2006.05172.x.

Zhang S, Kingsley RA, Santos RL, Andrews-Polymenis H, Raffatellu M, Figueiredo J, Nunes J, Tsolis RM, Adams LG and Bäumler AJ. (2003). Molecular pathogenesis of *Salmonella enterica* serotype typhimurium-induced diarrhea. *Infect. Immun.* 71, 1–12. 10.1128/IAI.71.1.1-12.2003.

Zheng J, Keys CE, Zhao S, Meng J, Brown EW. Enhanced Subtyping Scheme for *Salmonella* Enteritidis. *Emerging Infectious Diseases*. 2007;13(12):1932-1935. doi:10.3201/eid1312.070185.

Zuliani M, Rocco G, Bruschetta G, Benedetti I, Owczarek S, Dionisi AM, Lucarelli C and Luzzi I. (2012). *Salmonella* Napoli waterborne outbreak in a school in Italy. In: The European Scientific Conference on Applied Infectious Disease Epidemiology (ESCAIDE), Edinburgh.

## 7. SITOGRAFIA

BioEdit, <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/page2.html>

BLAST, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>

CDC, Infectious Disease Surveillance, [www.cdc.gov](http://www.cdc.gov)

ECDC, Surveillance of communicable diseases in the European Union, [www.ecdc.europa.eu](http://www.ecdc.europa.eu)

Enter-Net Italia, <http://www.iss.it/ente>

FastQC, <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>

Global Foodborne Infection Network, [www.who.int/gfn](http://www.who.int/gfn)

Google Earth, <https://www.google.com/earth>

ISTAT, [www.demo.istat.it](http://www.demo.istat.it)

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, <http://www.izsler.it>

MAINF, [www.mainf.regione.lombardia.it](http://www.mainf.regione.lombardia.it)

Mega, <http://www.megasoftware.net>

Ministero della Salute, Sistemi di sorveglianza, [www.salute.gov.it](http://www.salute.gov.it)

*Salmonella* – EpiCentro – ISS, <http://www.epicentro.iss.it/problemi/salmonella/salmonella.asp>

*Salmonella enterica* MLST database, <http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Senterica>

SPREAD, <http://www.kuleuven.be/aidslab/phylogeography/SPREAD.html>

Tracer, <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer/>

Data dell'ultimo accesso alle URL citate: 31 ottobre 2017.