

# Presenza di *Salmonella* spp. nelle acque superficiali: approccio molecolare per un rapido monitoraggio

Antonella Giorgio<sup>1\*</sup>, Salvatore De Bonis<sup>2</sup>,  
Anna Trotta<sup>1</sup>, Francesco Aliberti<sup>1</sup>, Marco Guida<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Università degli Studi di Napoli Federico II, Dipartimento di Biologia, Complesso Universitario di Monte Sant'Angelo, via Cinthia Ed. 7 – 80126 Napoli, Italia

<sup>2</sup> Agenzia Regionale per la Protezione Ambientale del Lazio, Sez. Frosinone Via Armando Fabi 212 – 03100 Frosinone

\* Referente per la corrispondenza: antonella.giorgio@unina.it

Pervenuto il 3.4.2017; accettato il 15.5.2017

## Riassunto

La presenza di *Salmonella* nell'ambiente acquatico può essere indice o di una contaminazione fecale primaria, dovuta ad immissione diretta di scarichi fognari, o di una secondaria, ad esempio per dilavamento da suoli contaminati. Scopo del lavoro è stato quello di individuare la presenza di *Salmonella* spp. in acque superficiali utilizzando tecniche di biologia molecolare sia per una rapida individuazione che per una più precisa caratterizzazione tassonomica. I campioni d'acqua sono stati prelevati in quattro fiumi della Campania, per un totale di 26 matrici analizzate. In ciascun fiume il monitoraggio è stato eseguito procedendo dalla sorgente alla foce e individuando alcune stazioni di campionamento a monte e a valle di scarichi di depurazione. I risultati evidenziano la presenza di *Salmonella* spp. in alcuni campioni a valle degli scarichi e nel tratto fluviale terminale. Le analisi molecolari sono state utili ed efficaci nel rivelare la presenza di *Salmonella* spp. nei campioni fluviali, in tempi estremamente ridotti rispetto a quelli richiesti dalle metodiche tradizionali, riuscendo ad ottimizzare le procedure di rilevazione e segnalare nel minor tempo possibile fenomeni di contaminazione in atto, risultando anche più precise per la tipizzazione dei sierotipi isolati. Lo scopo del lavoro è quindi quello di confrontare i risultati, i tempi ed i costi dei due approcci analitici.

PAROLE CHIAVE: batteri patogeni / fiumi / monitoraggio microbiologico / tecniche molecolari /

## Occurrence of *Salmonella* spp. in river water: a rapid monitoring by molecular approach

*Salmonella* spp. is an indicator of water quality and the presence of bacterium is associated with primary or secondary fecal contamination. The aim of this study was to analyze the presence of *Salmonella* spp. in river waters by using microbiological and molecular techniques. Water samples were collected at 26 sites from 4 rivers of Campania, between 2015 and 2016. Results show the presence of *Salmonella* spp. in downstream sites of discharge and at the mouth. Molecular approach turned out to be most rapid and precise for taxonomic identification of bacteria isolated. The presence of *Salmonella* spp. in aquatic environments investigated confirmed the need for monitoring in order to minimize the risks of infection to human.

KEY WORDS: pathogenic bacteria / rivers / microbiological monitoring / molecular techniques

## INTRODUZIONE

Il genere *Salmonella* spp. comprende microrganismi Gram negativi, di forma bastoncellare appartenenti alla famiglia delle Enterobacteriaceae. I membri del genere hanno quale habitat primario il tratto intestinale dell'uomo e degli animali, nonostante l'ampia distribuzione di numerose specie in ambiente naturale (suoli, laghi, fiumi,

acque marino-costiere). La presenza di salmonella nell'ambiente acquatico può essere indice o di una contaminazione fecale primaria, dovuta ad immissione diretta di scarichi fognari, o di una contaminazione secondaria, ad esempio per dilavamento da suoli contaminati. Il genere comprende numerosi sierotipi capaci di causare danni intestinali

oltre che gravi patologie sistemiche, tra cui la febbre tifoide e paratifoide (Pond, 2005). Così come per gli altri enterobatteri, la trasmissione e la contaminazione di *Salmonella* spp. avvengono per via oro-fecale. Di conseguenza le acque naturali sono ritenute un veicolo importante di trasmissione del patogeno all'uomo e ad altri animali (Ashbolt, 2004).

Numerosi studi hanno inoltre dimostrato la capacità di sopravvivenza dei microorganismi per periodi anche molto lunghi nel suolo, nei sedimenti e nelle acque: ciò consente loro di proliferare e diffondere all'interno dell'intera catena trofica (Gorski *et al.*, 2011).

Il metodo diagnostico per la ricerca di *Salmonella* spp. indicato dalla normativa ambientale nazionale, D.Lgs. 152/99, essendo di tipo qualitativo, non prevedeva il conteggio del numero di salmonelle nel campione, in quanto la sola presenza del patogeno escludeva la possibilità di utilizzo delle acque per uso potabile. L'attuale Decreto Legislativo 152/2006 indica per il parametro *Salmonella* tre categorie di valori guida in base ai quali andranno adottati differenti livelli di trattamento per la potabilizzazione dell'acqua dei corpi idrici destinati alla produzione di acqua potabile. L'aspetto quantitativo è determinato dal volume d'acqua filtrato e la ricerca delle salmonelle non è richiesta qualora l'impianto di potabilizzazione sia dotato di trattamento fisico e chimico spinto, di affinazione e di disinfezione.

Le tecniche tradizionali per la ricerca delle salmonelle si basano sulla crescita in terreni selettivi, seguita da conferme biochimiche e test sierologici; nel complesso richiedono tempo e risultano laboriose, oltre che costose (Olsen *et al.*, 1995; Fung, 2002). Fortunatamente, negli ultimi anni stanno diffondendosi metodi di indagine più sensibili, finalizzati alla ricerca immediata dei microorganismi in ambiente naturale (Shaban *et al.*, 2008). Primeggiano le tecniche di biologia molecolare basate sull'estrazione del DNA, l'amplificazione PCR (Polymerase Chain Reaction) e il sequenziamento genico finalizzato alla tipizzazione dei vari seriotipi (Kim *et al.*, 2006; Trafny *et al.*, 2006; Silva *et al.*, 2011).

In questo studio viene presentata un'esperienza di monitoraggio di alcuni corsi d'acqua della Campania finalizzata a individuare l'eventuale presenza di *Salmonella* spp. mediante l'applicazione di tecniche di biologia molecolare; lo studio si è prefissato di ottimizzare le metodiche di rilevazione con l'obiettivo di rendere sempre più rapida la segnalazione di fenomeni di contaminazione in atto.

## MATERIALI E METODI

Ventisei campioni d'acqua prelevati tra marzo e ottobre 2016 in quattro fiumi della Campania –seguendo una frequenza casuale, non legata a particolari eventi climatici (es. piogge intense, prolungati periodi di siccità)– sono stati analizzati in doppio adottando sia tecniche microbiologiche che tecniche molecolari.

Il campionamento è stato eseguito in corrispondenza della sorgente e della foce di ciascun fiume investigato e in alcune stazioni poste a monte e a valle di scarichi di depurazione, seguendo le indicazioni riportate nella Normativa ISO 5667 (Parte 2). Il campionamento è stato eseguito con bottiglie sterili della capacità di 1000 mL, immerse contro corrente; i campioni sono stati immediatamente refrigerati ( $4\pm 2$  °C) e in tali condizioni trasferiti in laboratorio.

I campioni d'acqua sono stati analizzati con tecniche microbiologiche, in accordo con le linee guida APAT, CNR-IRSA 7080 (2003). Il metodo consente di valutare la presenza/assenza di *Salmonella* spp. in un determinato volume di acqua. La procedura analitica consiste in una serie di fasi successive che comprendono prearricchimento, arricchimento, isolamento ed eventuale conferma biochimica. Sono stati filtrati 1000 mL di campione utilizzando una membrana a porosità nominale 0,45 µm, rispettan-

do le comuni norme di asepsi. Le membrane sono state trasferite sterilmente in 100 mL di Acqua Peptonata Tamponata e incubate a  $36\pm 1$  °C per 18-24 ore. Trascorsi i tempi di incubazione è stato eseguito l'inoculo di un'aliquota del campione (100 µL) in brodo di arricchimento Rappaport Vassiliadis (10 mL), incubata poi per 24 ore. Dal brodo di arricchimento sono state preparate subcolture per strisci multipli sul terreno di isolamento Xilosio Lisina Desossicolato (XLD - Oxoid); le piastre sono state incubate a  $36\pm 1$  °C per 24 ore. Su terreno selettivo le colonie sospette di *Salmonella* si presentano rosse con centro nero, lucide, convesse e con margini netti. La conferma biochimica delle colonie attribuite al genere *Salmonella* spp. è stata eseguita mediante test di agglutinazione al lattice (Latex test - Oxoid).

Le analisi molecolari sono state eseguite su un volume filtrato di acqua pari a 100 mL. Le membrane con cui è stata effettuata la filtrazione, aventi porosità nominale 0,45 µm, sono state eluite in acqua ultrapura (10 mL) e agitate vigorosamente per circa 1 min. 100 µL di soluzione sono stati sottoposti ad estrazione del DNA basata su denaturazione al calore (98 °C per 10 min), successiva centrifugazione e recupero del surnatante (Ivanov *et al.*, 1987). 5 µL di surnatante (contenente il DNA batterico) sono stati sottoposti ad amplificazione PCR utilizzando quale marcatore molecolare il gene *InvA* (Galàn *et al.*, 1992; Levin, 2009). Il marcatore selezionato codifica per specifiche proteine responsabili dell'attacco delle cellule bersaglio e quindi della patogenicità. La positività della reazione di amplificazione è stata valutata mediante corsa elettroforetica dei campioni su gel di agarosio 1,5 %, colorato con GelRed (Amresco). I prodotti di amplificazione, lunghi circa 284 coppie di basi (bp), sono

stati stimati mediante confronto con marcatori a peso molecolare noto (DNA Ladder – 50bp). I prodotti di amplificazione sono stati purificati e sottoposti a sequenziamento automatico (AppliedBiosystem). L'analisi delle sequenze e il confronto di queste con le sequenze di riferimento presenti nel database online BLAST ha consentito la tipizzazione dei ceppi batterici isolati e il loro riconoscimento tassonomico.

## RISULTATI

In tabella I sono riassunti i risultati delle indagini microbiologiche e molecolari effettuate sui campioni d'acqua. La loro corrispondenza in termini di presenza/assenza risulta completa.

Sette dei campioni analizzati sono risultati positivi per la presenza di *Salmonella* spp.: si tratta

delle acque raccolte a valle degli scarichi e nel tratto fluviale terminale. L'analisi delle sequenze ha consentito la tipizzazione tassonomica degli isolati batterici, evidenziando la presenza dei sierotipi *Salmonella enterica* subspecies I e *Salmonella enteritidis* (campioni S006, S0015, S025).

Diciannove campioni sono invece risultati negativi per la presenza di *Salmonella* spp.

## DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

L'esperienza descritta sembra dimostrare che le analisi molecolari potrebbero rappresentare un validissimo strumento routinario per la ricerca di *Salmonella* spp. nelle acque. Risultano rapide –in quanto non richiedono i lunghi tempi di incubazione delle analisi

microbiologiche– e sono efficaci per rendere più precisa la tipizzazione e l'individuazione dei sierotipi patogeni. Il dato presenza/assenza risulta inoltre inequivocabile poiché si basa sulla presenza o sull'assenza di un prodotto di amplificazione ottenuto, tra l'altro, con un gene specifico e presente unicamente in *Salmonella*.

Per l'esecuzione dell'analisi ci si serve di una strumentazione base per un laboratorio di biologia, e comprende un termociclatore classico per PCR end-point.

Strumentazioni più specifiche, quali Real time PCR e sequenziatore, sarebbero necessarie solo nel caso in cui si voglia: 1) procedere con la determinazione quantitativa del numero di salmonelle, 2) tipizzare i sierotipi isolati.

Il genere *Salmonella*, come

**Tab. I.** Risultati delle analisi microbiologiche e molecolari condotte sui campioni di acqua superficiale (- = assenza; + = presenza).

	Campione	Sito	Risultato analisi microbiologica	Risultato analisi molecolare
<b>Fiume 1</b>	S001	Sorgente	0 UFC/100 mL	-
	S002	Monte depuratore 1	0 UFC/100 mL	-
	S003	Valle depuratore 1	0 UFC/100 mL	-
	S004	Monte depuratore 2	0 UFC/100 mL	-
	S005	Valle depuratore 2	2 UFC/mL	+
	S006	Foce	8 UFC/mL	+
<b>Fiume 2</b>	S007	Sorgente	0 UFC/100 mL	-
	S008	Monte depuratore 1	0 UFC/100 mL	-
	S009	Valle depuratore 1	0 UFC/100 mL	-
	S010	Monte depuratore 2	0 UFC/100 mL	-
	S011	Valle depuratore 2	0 UFC/100 mL	-
	S012	Foce	2 UFC/mL	+
<b>Fiume 3</b>	S013	Sorgente	0 UFC/100 mL	-
	S014	Monte depuratore 1	0 UFC/100 mL	-
	S015	Valle depuratore 1	4 UFC/mL	+
	S016	Monte depuratore 2	0 UFC/100 mL	-
	S017	Valle depuratore 2	0 UFC/100 mL	-
	S018	Foce	0 UFC/100 mL	-
<b>Fiume 4</b>	S019	Sorgente	0 UFC/100 mL	-
	S020	Monte depuratore 1	0 UFC/100 mL	-
	S021	Valle depuratore 1	5 UFC/mL	+
	S022	Monte depuratore 2	0 UFC/100 mL	-
	S023	Valle depuratore 2	1 UFC/mL	+
	S024	Monte depuratore 3	0 UFC/100 mL	-
	S025	Valle depuratore 3	3 UFC/mL	+
	S026	Foce	0 UFC/100 mL	-

ampiamente dimostrato, comprende batteri patogeni per l'uomo trasmissibili facilmente attraverso la matrice acqua. La presenza di *Salmonella* spp. negli ecosistemi fluviali indica la diffusione del microorganismo nell'ambiente e la presenza di contaminazioni fecali in atto (Winfield e Groisman, 2003).

Nella nostra esperienza le analisi molecolari sono state utili ed efficaci nel rivelare la presenza di *Salmonella* spp. nei campioni fluviali, riuscendo a segnalare in circa 3-4 h i fenomeni di contaminazione.

Il sierotipo *Salmonella enterica* subspecies I è responsabile della maggior parte delle infezioni da salmonella negli animali a sangue caldo e, così come *Salmonella enteritidis*, è facilmente diffuso attraverso le matrici ambientali.

La ricerca di *Salmonella* spp.

nelle acque superficiali è di fondamentale importanza per la tutela della salute pubblica e, quale parametro microbiologico, andrebbe costantemente monitorato. Tra le principali cause della contaminazione si considerano: 1) la presenza di agglomerati urbani non allacciati alla rete fognaria e provvisti di trattamenti di tipo individuale; 2) la presenza di agglomerati urbani allacciati alla rete fognaria ma non sottoposti a depurazione; 3) i carichi inquinanti immessi nel corpo idrico recettore attraverso gli scaricatori di piena degli impianti pubblici di depurazione e delle reti fognarie.

Tuttavia, allo stato attuale, i risultati del monitoraggio eseguito non consentono di definire il rischio potenziale per la salute umana connesso alla presenza del patogeno. In tal caso bisognerebbe ampliare il

campo di indagine da un punto di vista epidemiologico, valutando ad esempio se si sono verificati casi di malattia o intossicazione riconducibili al periodo di campionamento e se le acque o gli organismi acquatici dei fiumi investigati siano utilizzati quale fonte alimentare.

Programmi di monitoraggio continui, su scala temporale e spaziale molto più ampia, andrebbero effettuati per evidenziare la presenza di salmonella nelle acque, in quanto la sola presenza del patogeno può rappresentare un rischio potenziale. Quest'ultimo va ricondotto innanzitutto all'uso delle acque per l'irrigazione di vegetali da consumare crudi, e in secondo luogo al consumo di organismi acquatici –soprattutto pesci– senza l'applicazione di opportune pratiche igieniche preventive.

## Bibliografia

- APAT, IRSA-CNR, 2003. Metodi analitici per le acque. Metodi per la determinazione di microrganismi indicatori d'inquinamento e di patogeni. ISBN 88-448-0083-7 pag. 865-984.
- Ashbolt R., Kirk M.D., 2006. *Salmonella* Mississippi infections in Tasmania: The role of native Australian animals and untreated drinking water. *Epidemiology and Infection*, **134**: 1257-1265.
- Fung D.Y.C., 2002. Rapid methods and automation in microbiology. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, **1**: 3-22.
- Galàn J.E., Ginocchio C., Costeas P., 1992. Molecular and functional characterization of the *Salmonella* invasion gene *invA*: homology of *InvA* to members of a new protein family. *Journal of Bacteriology*, **174** (13): 4338-49.
- Gorski L., Parker C.T., Liang A., Cooley M.B., Jay-Russell M.T., Gordus A.G., Atwill E.R., Mandrell R.E., 2011. Prevalence, distribution, and diversity of *Salmonella enterica* in a major produce region of California. *Applied and Environmental Microbiology*, **77**: 2734-2748.
- ISO 5667-2. Qualità dell'acqua – Campionamento – Parte 2: guida per le tecniche di campionamento, 17 pp.
- Ivanov I.G., Bachvarov D.R., 1987. Determination of plasmid copy number by the "boiling" method. *Analytical Biochemistry*, **165** (1): 137-41.
- Kim H.J., Park S.H., Lee T.H., Nahm B.H., Chung Y.H., Seo K.H., Kim H.Y., 2006. Identification of *Salmonella* enteric serovar Typhimurium using specific PCR primers obtained by comparative genomics in *Salmonella* serovars. *Journal of Food Protection*, **69**: 1653-1661.
- Levin R.E., 2009. *Rapid Detection and Characterization of Foodborne Pathogens by Molecular Techniques*. CRC press Taylor & Francis Group, 608 pp.
- Olsen J.E., Aabo S., Hill W., Notermans S., Wernars K., Granum P.E., Popovic T., Rasmussen H.N., Olsvik O., 1995. Probes and polymerase chain reaction for detection of foodborne bacterial pathogens. *International Journal of Food Microbiology*, **28**: 1-78.
- Pond K., 2005. *Water recreation and disease infections: Plausibility of associated acute effects, sequelae and mortality*. London: IWA Publishing, World Health Organization, 239 pp.
- Shaban A.M., Haroun B.M., Ali M.A., Elras M.A., 2008. Comparison between conventional membrane filter and PCR methods for detection of coliform, *E. coli* and *Salmonella* in drinking water. *Journal of Applied Sciences Research*, **4**: 1769-1776.
- Silva D.S.P., Canato T., Magnani M., Alves J., Hirooka E.Y., Oliveira T.C.R.M., 2011. Multiplex PCR for the simultaneous detection of *Salmonella* spp. and *Salmonella* Enteritidis in food. *International Journal of Food Science & Technology*, **46**: 1502-1507.
- Trafny E.A., Kozłowska K., Szpakowska M., 2006. A novel Multiplex PCR assay for the detection of *Salmonella* enteric serovar Enteritidis in human faeces. *Letters in Applied Microbiology*, **43**: 673-679.
- Winfield M., Groisman E., 2003. Role of nonhost environments in the lifestyles of *Salmonella* and *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, **69**: 3687-3694.

