

SALMONELLA TYPHIMURIUM

Episodio di salmonellosi in passeri del centro Italia

Franca Agnetti, Alessio Zicavo, Stefania Scuota, Mario Latini

IZS dell'Umbria e delle Marche

Ol passero, anche chiamato passera d'Italia (*Passer italiae*, Vieillot 1817), è una specie ormai strettamente sinantropa, frequentando prevalentemente i centri abitati permanenti e le campagne coltivate. Essendo un uccello onnivoro, si alimenta con semi, frutta, insetti e rifiuti alimentari dell'uomo.

La presente nota riguarda un episodio di salmonellosi clinicamente manifesta in esemplari di passero verificatosi

in Umbria durante il periodo invernale.

L'episodio, costituito da più focolai, è stato caratterizzato da un aumento improvviso della mortalità, tale da fare inizialmente sospettare un avvelenamento. Oggetto di moria sono stati in particolare i passeri presenti in una valle di una frazione di Castel dell'Aquila (TR). Tale valle è completamente boscosa; le abitazioni che vi sorgono non sono collegate alla rete idrica pubblica, ma sono provviste di pozzi neri a perdere (foto 1).

In ciascun focolaio è stata registrata la morte di un numero consistente di uccelli (20 - 30) in un arco di tempo di pochi giorni. Questi sono stati trovati in varie zone della valle sia dove è presente una folta vegetazione, sia vicino alle abitazioni civili (in un caso anche sul terrazzo di una casa).

Materiali e Metodi

Sui soggetti esaminati è stato effettuato un esame anatomico patologico, un esame parassitologico e un esame batteriologico per la ricerca di Salmonella.

L'esame batteriologico è stato effettuato sui seguenti terreni: prearricchimento con acqua peptonata tamponata incubata a 37°C per 18 ore, arricchimento selettivo in brodo Rappaport Vassiliadis



Foto 1. Pozza di acqua stagnante collegata con uno scarico domestico.

incubato a 42°C per 24 ore, terreno solido cromogeno selettivo per salmonella incubato a 37°C per 24 ore.

Per l'identificazione biochimica dei ceppi isolati ci si è avvalsi di sistemi in micrometodo (API RAPID 20E, Biomerieux). La tipizzazione sierologica dei ceppi è stata eseguita mediante agglutinazione rapida su vetrino, utilizzando antisieri polivalenti e monovalenti del commercio (*Statens Serum*

Institut, Copenhagen). Sui ceppi isolati è stato inoltre eseguito l'antibiogramma secondo il metodo descritto da Kirby-Bauer (1966).

Al fine di stabilire una correlazione epidemiologica tra i vari casi, i ceppi isolati sono stati sottoposti a elettroforesi in campo pulsato (PFGE), che è stata eseguita seguendo il protocollo Salmgene [2].



Foto 2. Enterite.



Foto 4. Presenza di materiale fibrinoso in ingluvie.



Foto 3. Splenomegalia.



Foto 5. Lane 1 e 6: marker *Salmonella* Braenderup. Lane 2, 3: ceppi di *Salmonella* Typhimurium isolati da passeri. Lane 4: ceppo di *Salmonella* Typhimurium isolato da passero in episodio non correlato.



Le cellule batteriche, lasciate crescere una notte in piastre di TSA, sono state risospese in 1 ml di CSB (*cell suspension buffer*: 100mM TRIS, 100mM EDTA, pH 8) fino ad aggiustarne la concentrazione a un valore di densità ottica pari a 0.50-0.55 a 600nm. A 500 µl della sospensione sono stati poi aggiunti 20 µl, pari a 8 U, di Proteinasi K (Invitrogen, 20mg/ml, 400 U) e 500 µl di agarosio (Certified Megabase Agarose, BIO-RAD) sciolto al 2% in tampone TE (TRIS 10mM, EDTA 1.0mM, pH 8.0) e raffreddato a 55°C; il tutto è stato quindi dispensato in appositi stampi (Plug molds, BIO-RAD) e lasciato solidificare.

I blocchetti di agar così ottenuti sono stati posti nel tampone di lisi Clysris B (TRIS 50mM, EDTA 50mM, Sarkosyl 1%, pH 8) addizionato con 3 U di Proteinasi K e incubati per 2 ore a 55°C in bagnomaria sotto agitazione. Completata la lisi sono stati effettuati 2 lavaggi con 5 ml di acqua milliQ sterile e 3 con 5 ml di tampone TE, della durata di 10' ciascuno a 55°C in bagnomaria sotto agitazione.

Per la restrizione del DNA batterico è stato impiegato l'enzima XbaI (Promega) in quantità di 50 U a 37°C per 4 ore. La corsa elettroforetica è stata effettuata in gel all'1% (Pulsed Field Gel Agarose, BIO-RAD) in tampone TBE 0.5X (TRIS 50mM, acido borico 50mM, EDTA 0.5mM), usando come marker il ceppo di riferimento Salmonella Braenderup H9812, utilizzando il sistema CHEF-DR III (BIO-RAD) per 22 ore a 14°C, 6V/cm, *switch time* da 2s a 64s e angolo di emissione pari a 120°.

Il gel è stato quindi colorato per immersione in una soluzione di etidio bromuro (0.4 µg/ml) per 20', lavato con acqua distillata per 40' e quindi fotografato con transilluminatore UV.

Risultati

All'esame esterno i soggetti hanno evidenziato un buono stato nutrizionale e una livrea conservata. L'esame anatomo-patologico ha evidenziato enterite catarrale con imbrattamento della regione cloacale. Il contenuto intestinale è risultato di consistenza liquida e di colore giallastro (foto 2). Gli organi interni non hanno mostrato evidenti anomalie tranne una spiccata splenomegalia (foto 3). La lesione più caratteristica ed evidente è stata la presenza di una membrana fibrinosa simil difterica in ingluvie in tutti i soggetti esaminati (foto 4). La ricerca di ecto- ed endoparassiti è risultata negativa. L'esame batteriologico ha permesso di evidenziare da tutte le matrici la crescita in purezza di batteri, successivamente identificati come *Salmonella enterica* subsp. *enterica*. I ceppi, sottoposti a tipizzazione sierologica, sono risultati appartenere tutti al serovar Typhimurium. Tutti i ceppi hanno evidenziato sensibilità nei confronti di beta lattamici (amoxicillina, ampicillina, apramicina), colistina, chinoloni (enrofloxacin, flumequina) sulfatrimetoprim, aminoglicosidi (gentamicina, kanamicina); solo per neomicina è risultata una sensibilità intermedia.



I profili elettroforetici ottenuti con la PFGE e interpretati secondo quanto descritto da Tenover [3], hanno evidenziato una stretta correlazione tra i ceppi esaminati (foto 5).

Discussione

Salmonella Typhimurium è una *Salmonella* di frequente isolamento, sia in campo umano, dove è spesso causa di forme gastroenteriche, sia in ambito veterinario [4]. Le fonti di contaminazione per l'uomo possono essere molteplici: cibo e acqua sono le vie di trasmissione più comuni. Nel caso oggetto della presente nota, vista la presenza nella valle di piccoli allevamenti familiari di animali da cortile destinati al consumo domestico che non hanno avuto nessun segno di malattia, si può ipotizzare una diffusione in cui popolazione umana e volatili selvatici risultano epidemiologicamente correlati. Le condizioni stressanti come le basse temperature invernali (di notte si sfiorano gli 0°C) e la scarsità di alimento possono facilmente essere predisponenti all'azione di agenti patogeni infettivi, tra cui *Salmonella* spp. Sempre da un punto di vista epidemiologico, non è da escludere la presenza, fra gli abitanti della zona, di uno o più portatori sani che abbiano contribuito a diffondere il germe nei pozzi neri. I passerai avrebbero potuto quindi infettarsi assumendo l'acqua contaminata direttamente dalle pozze che si formano in prossimità degli scarichi.

I profili elettroforetici ottenuti non sono sovrapponibili a nessuno dei quattro pulstotipi di *Salmonella* Typhimurium che maggiormente si riscontrano da casi clinici umani nella Regione Umbria e che costituiscono circa la metà degli isolati. Ciò nonostante non si può escludere l'origine umana di tali ceppi, in quanto, allo stato attuale, si ha conoscenza di una grande varietà di altri pulstotipi molto più rari o non ancora codificati.