

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ

Infezioni da *Salmonella*: diagnostica, epidemiologia e sorveglianza

Caterina Graziani (a), Pasquale Galetta (b), Luca Busani (a),
Anna Maria Dionisi (b), Emma Filetici (b), Antonia Ricci (c),
Alfredo Caprioli (a), Ida Luzzi (b)

(a) Dipartimento di Sanità Alimentare ed Animale, Istituto Superiore di Sanità, Roma

*(b) Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie ed Immunomediate,
Istituto Superiore di Sanità, Roma*

*(c) Laboratorio di Referenza Nazionale per le Salmonellosi,
Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Padova*

ISSN 1123-3117

Rapporti ISTISAN

05/27

Istituto Superiore di Sanità

Le infezioni da *Salmonella*: diagnostica, epidemiologia e sorveglianza.

Caterina Graziani, Pasquale Galetta, Luca Busani, Anna Maria Dionisi, Emma Filetici, Antonia Ricci, Alfredo Caprioli, Ida Luzzi
2005, 49 p. Rapporti ISTISAN 05/27

Nei Paesi industrializzati, le infezioni trasmesse da alimenti rappresentano un importante problema di sanità pubblica, e circa la metà degli episodi di malattia nell'uomo sono causati da salmonelle. Gli episodi epidemici sono frequenti e possono essere perfino trans-nazionali, quando sono implicati prodotti di tipo industriale e la grande distribuzione. Le salmonellosi sono oggetto di attività di sorveglianza, infatti la normativa comunitaria sul controllo delle zoonosi (Direttiva 99/2003/CE, Regolamento 2160/2003/CE) le ha incluse tra le attività obbligatorie per i vari Stati. Enter-Net è una rete internazionale per la sorveglianza delle infezioni enteriche che effettua il monitoraggio delle infezioni da *Salmonella*. In Italia il sistema coordinato dall'Istituto Superiore di Sanità coinvolge numerosi laboratori del Servizio Sanitario Nazionale. Il manuale ha lo scopo di dare indicazioni sulla biologia delle salmonelle, fornire protocolli per l'isolamento, l'identificazione biochimica, sierologia, fagica e molecolare e per i test di sensibilità agli antibiotici.

Parole chiave: *Salmonella*, Microbiologia, Epidemiologia

Istituto Superiore di Sanità

***Salmonella* infections: diagnosis, epidemiology and surveillance.**

Caterina Graziani, Pasquale Galetta, Luca Busani, Anna Maria Dionisi, Emma Filetici, Antonia Ricci, Alfredo Caprioli, Ida Luzzi
2005, 49 p. Rapporti ISTISAN 05/27 (in Italian)

Salmonellosis is one of the most common causes of foodborne human gastroenteritis over the world. *Salmonella* accounts for about half of the total number of foodborne diseases. Large outbreaks involving more Countries can occur when industrial production and global distribution of food are involved. Surveillance on *Salmonella* in human and animals is a compulsory activity at European level as stated in the new European Directive (99/2003) and the European Regulation (2160/2003). Enter-Net is an international surveillance network of gastrointestinal infections that collects data on salmonella isolates. In Italy Enter-Net is coordinated by the Istituto Superiore di Sanità (the Italian National Institute of Health) and involves microbiologic laboratories of the Public Health System. The aim of this report is to provide information about biology and epidemiology of *Salmonella* together with technical information on *Salmonella* identification, typing and antimicrobial susceptibility testing.

Key words: *Salmonella*, Microbiology, Epidemiology

Per informazioni su questo documento scrivere a: caterina.graziani@iss.it, alfredo.caprioli@iss.it.

Il rapporto è accessibile online dal sito di questo Istituto: www.iss.it.

Presidente dell'Istituto Superiore di Sanità e Direttore responsabile: *Enrico Garaci*
Registro della Stampa - Tribunale di Roma n. 131/88 del 1° marzo 1988

Redazione: *Paola De Castro, Sara Modigliani e Sandra Salinetti*
La responsabilità dei dati scientifici e tecnici è dei singoli autori.

© Istituto Superiore di Sanità 2005

INDICE

Introduzione	1
Tassonomia: classificazione delle salmonelle	2
Classificazione secondo Kauffmann-White.....	3
Classificazione secondo Le Minor.....	3
Caratteristiche microbiologiche	5
Caratteristiche biochimiche.....	5
Caratteristiche colturali.....	5
Caratteristiche antigeniche.....	6
Infezioni nell'uomo e negli animali	7
Meccanismo patogenetico.....	7
Adesione e invasività.....	8
Resistenza alla fagocitosi.....	9
Manifestazioni cliniche dell'infezione nell'uomo.....	10
Gastroenteriti.....	10
Infezioni extraintestinali.....	11
Manifestazioni cliniche dell'infezione negli animali.....	11
Antibioticoresistenza	12
Epidemiologia delle infezioni da salmonella	14
Serbatoi animali.....	14
Vie di trasmissione.....	15
Alimenti e derivati di origine animale.....	15
Altri alimenti.....	16
Ambiente.....	16
Profilassi	17
Metodi di laboratorio: isolamento e identificazione	19
Isolamento.....	19
Isolamento da campioni di origine umana.....	19
Isolamento da campioni di origine animale.....	20
Isolamento da alimenti.....	20
Isolamento da campioni ambientali.....	21
Identificazione.....	22
Tipizzazione sierologica.....	23
Tipizzazione fagica.....	25
Tipizzazione molecolare.....	25
Test di sensibilità agli antibiotici.....	26
Metodo di diffusione in Agar (Kirby Bauer).....	28
Salmonellosi in Italia e in Europa	29
Considerazioni conclusive.....	32
Bibliografia	33
Appendice A - Terreni utilizzati per l'isolamento e l'identificazione di <i>Salmonella</i>	37
Appendice B - Test per l'identificazione di <i>Salmonella</i>	47

INTRODUZIONE

Nel 1884 Georg Theodor August Gaffky isolò per la prima volta l'agente eziologico del tifo sospettando che appartenesse ad un gruppo di batteri in grado di causare forme enteriche sia nell'uomo che negli animali. Un paio di anni più tardi Daniel E. Salmon e Theobald Smith confermarono quell'ipotesi isolando dai suini un microrganismo oggi noto come *S. Choleraesuis*.

Le salmonelle sono microrganismi patogeni di origine zoonosica che riconoscono uno specifico ospite (sierotipo specie-specifici) o ospiti diversi (sierotipo adattati o ubiquitari). I sierotipi specie-specifici causano in genere forme sistemiche di malattia nella specie bersaglio; i sierotipi ospite-adattati sono così definiti poichè prediligono un particolare ospite animale ma possono infettare più specie animali e l'uomo e indurre malattia e infine i sierotipi ubiquitari provocano spesso infezioni inapparenti negli animali mentre nell'uomo sono responsabili di infezioni gastroenteriche, di solito acquisite attraverso l'ingestione di alimenti contaminati. Per i sierotipi di *Salmonella* a diffusione ubiquitaria il serbatoio di infezione è rappresentato da animali di varie specie; l'uomo acquisisce l'infezione attraverso alimenti come carne, prodotti caseari e uova, che possono essere contaminati fin dall'origine oppure in seguito, nel corso delle diverse fasi di preparazione e conservazione.

Le salmonelle sono, con i *Campylobacter*, i principali agenti di malattia a trasmissione alimentare nell'uomo, e il loro impatto sulla salute pubblica si mantiene costante nonostante interventi e politica di sicurezza alimentare volti a ridurre il rischio di infezione.

In questo lavoro verranno descritti i principali caratteri biochimici e microbiologici, la tassonomia delle salmonelle, le principali patologie che possono causare nell'uomo e nelle varie specie animali e la loro epidemiologia, descrivendo in particolare la realtà italiana.

TASSONOMIA: CLASSIFICAZIONE DELLE SALMONELLE

Il genere *Salmonella* appartiene alla famiglia delle Enterobacteriaceae, microrganismi bastoncellari, Gram negativi, asporigeni, generalmente mobili per la presenza di flagelli peritrichi, aerobi-anaerobi facoltativi, catalasi positivi, ossidasi negativi, prevalentemente lattosio e indolo negativi che crescono sui comuni terreni anche in presenza di sali biliari.

La famiglia delle Enterobacteriaceae comprende numerosi generi di interesse sanitario come *Escherichia*, *Shigella*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter* e molti altri. La loro identificazione, come evidenziato in Tabella 1, è possibile in base ad una serie di caratteri biochimici come la capacità di utilizzare particolari substrati, presenza di particolari enzimi, produzione di specifici prodotti metabolici e la loro capacità di fermentare particolari zuccheri.

Tabella 1. Caratteristiche differenziali dei più importanti generi di enterobatteri

Principali caratteri differenziali	Genere								
	<i>Salmonella</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Enterobacter</i>	<i>Serratia</i>	<i>Proteus</i>	<i>Yersinia</i>	<i>Escherichia</i>	<i>Shigella</i>	<i>Citrobacter</i>
Mobilità	-	-	+	+	+	-	+	-	+
Produzione di H ₂ S	+	-	-	-	+	-	-	-	+
Voges-Proskauer	-	+	+	+	V	-	-	-	-
Produzione di indolo	-	-	-	V	V	V	+	+	-
β-galattosidasi	-	+	+	+	-	+	+	V	+
Ureasi	-	+	-	V	+	V	-	-	V
Lisina decarbossilasi	+	+	+	+	-	V	V	-	-
Fermentazione lattosio	-	+	+	V	-	V	+	-	+
Fermentazione saccarosio	-	+	+	+	V	V	V	-	V

V variabile; + positivo; - negativo

All'interno del genere *Salmonella* esistono un gran numero di sierotipi, distinti sulla base della diversa composizione degli antigeni somatici e flagellari e talvolta anche in base ad alcuni caratteri biochimici.

Dai primi isolamenti ad oggi la classificazione del genere *Salmonella* è stata più volte profondamente rimaneggiata. Se inizialmente i ceppi di *Salmonella* isolati da diverse forme cliniche o da diversi ospiti venivano considerati come specie distinte, lo studio degli antigeni somatici (O) e flagellari (H) iniziato da White e portato avanti da Kauffmann, portò alla descrizione di un enorme numero di sierotipi che sostituirono, nella nomenclatura, le specie precedentemente identificate.

Le classificazioni delle salmonelle sono tante ma tra queste quelle più conosciute e utilizzate sono quella di Kauffmann-White, per quanto riguarda la tipizzazione in base al sierotipo, e quella di Le Minor per quanto riguarda la suddivisione in sottospecie.

Il genere *Salmonella* è distinto in due sole specie, *S. enterica* e *S. bongori*. La specie enterica è a sua volta suddivisa in sei sottospecie: enterica, salamae, arizonae, diarizonae, houtenae, indica. Oggi si conoscono più di 2400 sierotipi della specie enterica, e il sierotipo non è più identificativo di specie pertanto la nomenclatura non la riporta più in corsivo; peraltro i nomi

sono mantenuti solamente per i sierotipi appartenenti a *S. enterica* subsp. *enterica* (es. *S. Typhimurium*), mentre quelli ascrivibili alle altre sottospecie vengono identificati attraverso le relative formule antigeniche.

L'attuale classificazione che deriva da quelle di Kauffmann-White e quella di Le Minor riflette la presente tassonomia delle salmonelle ed è soggetta ad aggiornamenti annuali curati dal *WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella* con cui collaborano vari laboratori di riferimento internazionali.

Classificazione secondo Kauffmann-White

Kauffmann nel 1931 presentò lo schema di classificazione delle salmonelle, in uso fino ai nostri giorni e universalmente accettato. In realtà egli riscrisse, ampliandolo, uno schema precedente elaborato da Schultze, White e Scott. Lo schema si basa sul fatto che:

- il genere è rappresentato da bastoncini gram-negativi, aerobi, non sporigeni, per lo più mobili, che crescono bene sui comuni terreni, fermentano il glucosio e riducono i nitrati e non l'indolo, non idrolizzano l'urea, il VP, l'adonite, e non fermentano il saccarosio; con alcune eccezioni, non fermentano il lattosio;
- esistono 4 sotto-generi (denominati I, II, III, IV) differenziabili in base a poche prove biochimiche (Tabella 2), come indicato dallo schema di Kauffmann del 1966;
- i ceppi con la medesima formula antigenica, anche se con differenze biochimiche (ad esempio, fermentare o meno un certo zucchero oppure produrre e non produrre H₂S) appartengono allo stesso sierotipo.

Tabella 2. Test biochimici per la suddivisione del genere *Salmonella* in quattro sotto-generi

Test	I	II	III	IV
Fermentazione dulcitate	+	+	-	-
Fermentazione lattosio	-	-	+	-
Fermentazione salicina	-	-	-	+
Fermentazione malonato	-	+	+	-
Crescita in terreno KCN	-	-	-	+

Classificazione secondo Le Minor

Le sei sottospecie di *S. enterica* sono distinguibili in base alle prove biochimiche, sotto elencate, e che consentono anche di differenziare *S. enterica* da *S. bongori*. I sierotipi di *S. enterica* subsp. *enterica* sono spesso indicati con un nome che usualmente è correlato al luogo geografico nel quale il sierotipo è stato per la prima volta isolato. Il nome viene scritto in lettere romane e la prima lettera è maiuscola. I sierotipi appartenenti alle altre sottospecie sono designati dalle loro formule antigeniche, seguite dal nome della sottospecie (Tabella 3), come indicato da Le Minor (Le Minor L. *et al.* Designation of *Salmonella enterica* sp. as the type and only species of the genus *Salmonella*. *Int J System Bacteriol* 1987;37:465).

Tabella 3. Classificazione delle salmonelle

Specie	Sottospecie						Numero sottospecie
<i>S. enterica</i>	<i>enterica</i>						I
	<i>salamae</i>						II
	<i>arizonae</i>						IIIa
	<i>diarizonae</i>						IIIb
	<i>houtenae</i>						IV
<i>S. bongori</i>	<i>indica</i>						VI
							V

Test	<i>S. enterica</i>						<i>S. bongori</i>
	I	II	IIIa	IIIb	IV	VI	V
Fermentazione:							
<i>dulcitate</i>	+	+	-	-	-	+/-	+
<i>lattosio</i>	-	-	-	+	-	+/-	-
<i>salicina</i>	-	-	-	-	+	-	-
<i>sorbitolo</i>	+	+	+	+	+	-	-
<i>malonato</i>	-	+	+	+	-	-	-
<i>d(+)-tartrato</i>	+	-	-	-	-	-	-
Crescita in terreno KCN	-	-	-	-	+	-	+
ONPG	-	-	-	+	-	+/-	+

CARATTERISTICHE MICROBIOLOGICHE

Caratteristiche colturali

Le salmonelle crescono facilmente sui comuni terreni sintetici, sia liquidi che solidi. In terreni liquidi come Brodo nutritivo, *Trypticase Soy Broth* (TSB), brodo *Brain Heart Infusion* (BHI), si sviluppa una torbidità uniforme dopo 18-24 ore d'incubazione a +37 °C. Nei terreni liquidi d'arricchimento come Brodo selenito o Brodo tetrionato il grado di sviluppo è uguale o leggermente inferiore a quello ottenibile in brodi non selettivi (108/109 germi per mL dopo 24 ore a 37 °C). Su terreni solidi non selettivi, dopo incubazione a 37 °C per 24 ore, le colonie appaiono tonde, del diametro di 2-3 mm, a margine netto, convesse, incolori, generalmente a superficie liscia, lucente (fase S) e raramente a superficie opaca e ruvida (fase R).

Su Agar sangue le colonie raggiungono dimensioni leggermente maggiori rispetto ai comuni terreni solidi e non presentano emolisi. In alcuni casi si hanno salmonelle a crescita lenta, con colonie del diametro di 0,5-1 mm, tendenti a rimanere tali anche dopo prolungata incubazione. Si tratta delle cosiddette colonie "nane", tipiche quasi esclusivamente delle salmonelle ospite-adattate più difficili da coltivare (tra cui *S. Choleraesuis*, *S. Abortusequi*, *S. Abortusovis*, *S. Gallinarum*, *S. Pullorum*). Colonie di dimensioni maggiori si possono ottenere aggiungendo al terreno colturale sodio tiosolfato allo 0,1 % (metodo applicabile per le sub-colture in terreni non selettivi), oppure incubando per ulteriori 24 ore le piastre dei terreni di primo isolamento che mostrano microcolonie sospette. Sui terreni solidi selettivi e/o differenziali le colonie si presentano con diametro inferiore e colorazioni diverse. Trattandosi di terreni contenenti sostanze inibenti, dopo incubazione a +37 °C per 24 ore il numero di colonie formate è inferiore di almeno una potenza decimale rispetto a terreni non selettivi presi come paragone (BHI Agar). In provette di Kligler Iron Agar, seminate per striscio e successiva infissione, le salmonelle crescono in genere abbondantemente, mostrando uno "slant" alcalino (rosso) e un fondo acido (giallo), mascherato da formazione di solfuro di ferro nero (reazione H₂S positiva), accompagnato spesso da bolle di gas originato dalla fermentazione del glucosio.

Caratteristiche biochimiche

Il tipico profilo biochimico del genere *Salmonella* è evidenziato nella Tabella 4.

Tabella 4. Profilo biochimico del genere *Salmonella*

Reazione	Risultato	Reazione	Risultato
Produzione di indolo	-	Idrolisi dell'urea	-
Rosso metile	+	Voges-Proskauer	-
Riduzione dei nitrati	+	Fermentazione del glucosio+gas	+
Produzione di H ₂ S	+	Fermentazione del lattosio	-
Fermentazione del saccarosio	-	Fermentazione di salicina	-
Fermentazione di adonite	-	Fermentazione di mannite	+
Fermentazione del maltosio	+	Fermentazione di inosite	-
Fermentazione del sorbite	+	Liquefazione della gelatina	-
Sviluppo con NH ₄ citrato	+	Sviluppo con KCN	-

È importante ricordare che esistono a livello di specie e di ceppo numerose varianti al profilo biochimico sopra riportato.

Caratteristiche antigeniche

La cellula batterica di una *Salmonella* possiede numerosi antigeni e tra questi quelli più conosciuti sono gli antigeni somatici (O), termostabili e resistenti all'azione di acidi e alcool, gli antigeni ciliari (H), termolabili e l'antigene Vi (da virulenza).

– *Antigene O*

L'antigene O è presente sulla membrana esterna della cellula batterica, associato a molecole di lipopolisaccaride (LPS) ed è formato da due parti: la prima, più interna, è composta da cinque carboidrati ed è comune a tutti gli enterobatteri; la seconda, più esterna, è formata da catene saccaridiche, ciascuna delle quali contiene una sequenza di alcuni oligosaccaridi. Dal differente posizionamento degli oligosaccaridi nelle catene dipende la diversità degli antigeni somatici. Attualmente si conoscono 65 diversi antigeni O identificati con numeri arabi. Le salmonelle che presentano analogie nella struttura dell'antigene O vengono comunemente e per convenzione riunite in sierogruppi (A, B, C).

– *Antigeni H*

Nelle specie mobili di *Salmonella* (sono eccezioni *S. Gallinarum* e *S. Pullorum* che non sono mobili) sono presenti gli antigeni flagellari o ciliari meglio conosciuti come antigeni H, indicati con lettere minuscole dell'alfabeto o con numeri. Oggi se ne conoscono circa 35, sono di natura proteica, vengono distrutti dal calore e possono presentarsi in due fasi, chiamate fase 1 e fase 2. Gli antigeni di fase 1 e 2 possono presentarsi contemporaneamente al momento delle prove di agglutinazione. Spesso però una *Salmonella* bifasica sviluppa solo una delle due fasi e per completare la tipizzazione è necessario indurre l'inversione di fase (inibizione della fase identificata), in modo da far esprimere al germe anche la fase latente. Alcuni sierotipi di *Salmonella*, chiamati monofasici, possiedono generalmente antigeni di fase, come nel caso di *Salmonella* Enteritidis (formula antigenica 1,9,12:g,m-). Pochissime specie hanno 3 fasi sierologiche H e sono dette "trifasiche" (ad esempio *Salmonella* II con struttura antigene 44:z29-e,n,x:z42). Raramente le salmonelle possono perdere la struttura antigenica H, diventando immobili. Questo aspetto corrisponde ad una variazione reversibile, chiamata HO→O. Il fenomeno può dipendere dalla presenza, nella coltura in vitro, di sieri aggiunti che inibiscono lo sviluppo e la funzionalità dei flagelli.

– *Antigene Vi*

Alcune salmonelle presentano anche un terzo tipo di antigene, chiamato Vi (da virulenza), e gli stipti che lo possiedono risultano essere più virulenti (*S. Typhi*, *S. Paratyphi C*, *S. Dublin*). Esso ha la caratteristica di mascherare gli antigeni O, rendendoli inagglutinabili dai sieri somatici, per cui è necessario in questi casi riscaldare a 100 °C per 1 ora la sospensione batterica per renderla nuovamente agglutinabile. L'antigene Vi delle salmonelle corrisponde agli antigeni K (capsulari) degli altri enterobatteri. Il fenomeno della perdita di agglutinabilità con i sieri somatici è conosciuto come variazione reversibile, chiamata V→W.

INFEZIONI NELL'UOMO E NEGLI ANIMALI

La patogenesi delle infezioni da *Salmonella* è un fenomeno complesso e multifattoriale. Una volta ingerito, il batterio colonizza l'intestino, invade la mucosa intestinale e stimola la migrazione transepiteliale dei leucociti polimorfonucleati (PMN) con induzione di diarrea. In soggetti molto giovani o immunocompromessi l'infezione può propagarsi dall'intestino e divenire sistemica (1).

Le salmonelle possiedono diversi fattori di virulenza, necessari ad attuare tutte le varie fasi dell'infezione (2): sistemi di difesa che permettono la sopravvivenza in ambienti a pH acido, utili per superare la barriera gastrica (3); fattori che intervengono al momento della colonizzazione dell'intestino, permettendo al batterio di aderire efficacemente alle cellule del lume intestinale (fimbrie di tipo 1 e 3) (4); fattori che consentono di attraversare l'epitelio intestinale a livello delle placche di Peyer o di sopravvivere nei macrofagi (enzimi PhoP e PhoQ) (5). Ognuno di questi è codificato da geni strutturali, di modificazione e di regolazione. Le salmonelle sono in grado di elaborare: una tossina termolabile di natura proteica, simile alla enterotossina CT del colera e alla tossina tremolabile LT di *E. coli*, un fattore proteico termolabile prodotta dalla membrana batterica, capace di alterare la morfologia delle cellule epiteliali della mucosa intestinale; un lipopolisaccaride (LPS), costituente la membrana batterica, dotato di proprietà endotossica e di resistenza alla lisi (6).

Una volta avvenuta l'ingestione del microrganismo, lo sviluppo di un'infezione sintomatica dipende dal numero di batteri ingeriti (la dose minima infettante è ipotizzata tra 10^2 e 10^3 cellule), ma può variare nei diversi sierotipi e in dipendenza delle condizioni dell'ospite. Sono più colpiti da salmonellosi gli individui molto giovani (neonati) o molto anziani e quelli con ridotte difese immunologiche. Anche i fattori ambientali giocano un ruolo non trascurabile, essendo comprovato l'effetto nocivo della temperatura elevata, del grado di umidità, del sovraffollamento e dell'inquinamento chimico (6).

Meccanismo patogenetico

Come è stato evidenziato precedentemente, esiste una correlazione tra l'azione patogena di *Salmonella* e il suo corredo genetico. Solo i ceppi che possiedono determinati geni sono in grado di indurre malattia, mentre altri che ne sono privi, pur appartenendo allo stesso sierotipo, non sembrano essere patogeni. Un ruolo importante è svolto dai loci cromosomali specifici come SPI ed hil, e dai "plasmidi di virulenza" di 50-90-kbp che codificano altri fattori (1, 7). Questi plasmidi sono presenti in tutti gli isolati di *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Dublin*, *S. Choleraesuis*, *S. Infantis*, *S. Panama*, *S. Heidelberg* provenienti da infezioni sistemiche umane e animali, mentre spesso risultano assenti in isolati da feci, da alimenti e da tamponi ambientali. Ceppi di *S. Typhimurium* che non presentano questo plasmide sono ancora capaci di invadere la mucosa intestinale e di colonizzare il fegato e la milza del topo, ma mostrano una ridotta capacità di causare infezioni sistemiche. La perdita del plasmide di virulenza in *S. Typhimurium* non comporta una riduzione delle lesioni intestinali e della diarrea nel modello bovino per cui questa osservazione suggerisce che il plasmide di virulenza codifichi per fattori importanti dell'infezione sistemica ma secondari per la patogenesi della diarrea (8, 9). Queste proprietà di virulenza sono ritenute da molti Autori frutto di acquisizione da parte delle salmonelle di frammenti di DNA mediante trasmissione genetica orizzontale da altre specie batteriche (6).

Adesione e invasività

Quando interagiscono con cellule in coltura le salmonelle producono un'alterazione caratteristica della membrana cellulare (*ruffling*) accompagnata da estesi riarrangiamenti dei filamenti di actina nelle zone immediatamente adiacenti al sito di adesione del batterio alla membrana. Una volta fagocitato il batterio, la superficie della membrana cellulare e l'organizzazione dell'actina ritornano normali (10). L'invasività e il fenomeno del *ruffling* sono mediati da un gran numero di geni batterici, molti dei quali soggetti a regolazione dell'espressione durante le varie fasi del processo di invasione. Alcuni studi avevano identificato i geni *invA-H* di *S. Typhimurium* come necessari per l'invasione tissutale; oggi è noto che essi fanno parte del complesso macromolecolare denominato "Sistema di Secrezione di Tipo III" (*Type Three Secretion System*, TTSS) con cui i batteri patogeni Gram-negativi trasportano proteine effettrici dal citosol batterico direttamente nel citoplasma della cellula eucariotica (11, 12). Le proteine traslocatrici che costituiscono il sistema TTSS sono in grado di trasportare proteine effettrici fuori dal batterio attraversando la membrana cellulare e la parete batterica. Le proteine effettrici agiscono sulla cellula ospite eucariotica alterandone la fisiologia e permettendo la sopravvivenza del batterio nei tessuti invasivi. È stato dimostrato che le salmonelle possiedono due sistemi TTSS, denominati TTSS-1 e TTSS-2. I geni che codificano per le proteine coinvolte nella formazione dei sistemi TTSS sono localizzati in due estese regioni di DNA cromosomale, note come "Isole di Patogenicità di *Salmonella*" e denominate rispettivamente SPI1 e SPI2 (13, 14). I due sistemi di secrezione hanno mostrato ruoli differenti durante il processo patogenetico; nello specifico SPI1 è requisito essenziale per l'invasività della mucosa intestinale, mentre SPI2 influenza la virulenza sistemica, favorisce la crescita intracellulare del germe e la sua sopravvivenza nei macrofagi (12). È stato dimostrato che ceppi mutanti nei geni presenti su SPI1 sono ancora capaci di aderire alle cellule in coltura ma non mostrano più le stesse capacità invasive del tipo selvaggio e non inducono *ruffling*. Geni simili a quelli presenti in SPI1 di *S. Typhimurium* sono stati trovati anche in *S. Dublin*, *S. Typhi* e *S. Choleraesuis* e sono generalmente molto conservati nel genere *Salmonella* (2).

Nelle prime fasi dell'infezione *Salmonella* interagisce con gli enterociti e trasloca tramite il sistema TTSS-1 nel loro citosol quattro proteine effettrici denominate Sop (*Salmonella outer proteins*, dette anche Sig, *Salmonella invasion gene*). La proteina effettrice più importante è SopB, una tossina batterica enterotossica (detta anche SigD) codificata da un'altra isola di patogenicità denominata SPI-5 (13). SopB è una inositolo-fosfato fosfatasi che induce infiammazione intestinale e secrezione di fluidi. È noto che l'infezione da *Salmonella* induce l'innalzamento dei livelli cellulari di inositolo 1,4,5,6-tetrafosfato (Ins(1,4,5,6)P₄) con il risultato di stimolare la perdita di ioni cloro dalla cellula eucariotica e la secrezione di fluidi nel lume intestinale (15). Salmonelle mutanti per delezione del gene che codifica questa tossina sono ancora in grado di causare diarrea, sebbene a dosi infettanti più alte, indicando la presenza di altri fattori necessari per l'induzione dell'enterite. Ad esempio, è stata identificata nel genoma di *S. Typhimurium* l'enterotossina Stn, omologa alla tossina del colera, la cui funzione nell'induzione del fenomeno enteropatogenico non è ancora del tutto chiarita (16).

Lo studio dei fattori di invasività è generalmente condotto su modelli animali. Il topo e il ratto sono i più utilizzati in quanto *S. Typhimurium* riproduce una febbre tifoide paragonabile a quella provocata da *S. Typhi* nell'uomo. I bovini sono invece utilizzati come modello animale per riprodurre la gastroenterite da *S. Typhimurium*, con diarrea infiammatoria simile a quella che si sviluppa nell'uomo (8). Una volta penetrata nell'enterocita, *Salmonella* continua l'esportazione di proteine effettrici tramite il sistema TTSS-2. È stato dimostrato, in topi infettati per via intraperitoneale, che mutanti di *S. Typhimurium* nel sistema TTSS-2 risultano meno virulenti del ceppo selvaggio nell'indurre infezione sistemica, suggerendo un ruolo

importante di questo sistema nell'infezione invasiva. Una delle funzioni a cui contribuisce TTSS-2 è quella di aiutare la sopravvivenza e la proliferazione delle salmonelle nei macrofagi (2). Nel modello bovino di infezione da *S. Typhimurium* è stato invece dimostrato che il sistema TTSS-1 è responsabile della diarrea, ed è molto probabile che tale sistema funzioni analogamente anche nell'infezione umana.

Resistenza alla fagocitosi

Una volta superata la barriera intestinale a livello delle placche di Peyer, i batteri, come osservato in topi infettati, sono trasportati attraverso la via linfatica e il flusso sanguigno, ai linfonodi mesenterici, al fegato e alla milza. La risposta immunitaria dell'ospite viene evasa mediante la sopravvivenza all'interno del fagosoma dei macrofagi. Questo avviene grazie alla modulazione dell'espressione dei determinanti di virulenza che, nel caso di *Salmonella*, è un sistema a due componenti; il regolatore trascrizionale PhoP e il sensore, PhoQ (2, 5). PhoP è in grado di regolare la trascrizione di più di 40 geni, che possono essere attivati quando la *Salmonella* penetra nella cellula (geni *pag*, *phoP*-activated gene) o repressi nell'ambiente intracellulare (geni *prg*, *phoP*-repressed gene). Molti dei geni repressi da PhoP sono attivamente espressi nell'ambiente extracellulare, cioè durante le fasi dell'invasione dell'epitelio intestinale. Le due proprietà principali di *Salmonella*, l'induzione dell'endocitosi da parte delle cellule epiteliali e la sopravvivenza nei macrofagi, sono regolate in modo opposto dal sistema PhoPQ (17). Tra i geni soggetti alla regolazione PhoPQ troviamo quelli necessari per la modificazione dei lipopolisaccaridi (LPS), quelli che mediano il trasporto del magnesio, la resistenza all'azione della bile, la secrezione delle proteine effettrici da parte del sistema TTSS-1. PhoQ è una chinasi transmembranaria con un dominio periplasmatico che lega ioni Mg^{2+} . PhoQ capta i segnali esterni e fosforila la proteina PhoP, attivandone la capacità di legare il DNA. La proteina PhoP fosforilata è un fattore trascrizionale in grado di legare i promotori dei geni Pho-regolati. Mutazioni nel dominio chinasi di PhoQ hanno un effetto pleiotropico sulle capacità patogeniche di *S. Typhimurium*, che vanno dall'attenuazione della virulenza nel sistema murino alla incapacità di sopravvivere nei macrofagi in coltura, indicando quale sia l'importanza della corretta regolazione dei fattori di virulenza durante le varie fasi dell'infezione da *Salmonella* (5). Il sistema PhoPQ controlla anche *hil* (*hyperinvasion locus*), uno tra i loci più interessanti identificati per mutagenesi in *S. Typhimurium*. I geni del locus *hil* codificano per proteine regolatrici (HilA, HilC, HilD) che sono responsabili della modulazione a cascata dei fattori di trascrizione che a loro volta regolano l'espressione dei geni codificati nelle SPI1 e SPI5. Il gene *hilA* codifica per il regolatore centrale dei geni di invasione e può direttamente o indirettamente modulare l'espressione di SPI1 (1, 7).

Oltre ai geni cromosomali descritti, a livello plasmidico è stata osservata una regione altamente conservata di 8 kb chiamata *spv* (*Salmonella plasmid virulence*) associata ad una elevata gravità della malattia associata. Questa regione è presente più frequentemente in ceppi isolati da infezioni umane extraintestinali rispetto a ceppi isolati da campioni fecali o da campioni ambientali, e comprende un gene regolatore *spvR* e quattro geni strutturali *spvABCD*. I geni *spv* sembrano promuovere la fase macrofagica della malattia evitando così la distruzione del batterio da parte dei neutrofili e facilitando la proliferazione dei ceppi di *Salmonella* extraintestinali presenti nei vari siti di infezione.

Un controllo così complesso della regolazione dei geni di invasione garantisce al batterio grande flessibilità nell'espressione genica, permettendogli di esprimere i geni di virulenza in condizioni diverse a seconda del sito di infezione e della risposta dell'ospite. Mediante questo sofisticato sistema di controllo dell'espressione, *Salmonella* coordina anche la simultanea

espressione delle molecole effettrici e dei trasportatori che partecipano al sistema TTSS-1. L'espressione dei geni di invasione viene attivata nel lume intestinale ma è repressa all'interno dei macrofagi o in altri tessuti dove presumibilmente i prodotti genici necessari per l'invasione enterocitica non sono più richiesti e potrebbero addirittura risultare deleteri; nei macrofagi vengono attivate nuove funzioni necessarie alla sopravvivenza intracellulare (18, 19).

Manifestazioni cliniche dell'infezione nell'uomo

Le salmonelle rappresentano uno dei più comuni agenti eziologici di enteriti a trasmissione oro-fecale, insieme ad altri enterobatteri quali Shigelle ed *E. coli enteritogeni*. In neonati, bambini e adulti con precarie condizioni immunitarie, si assiste talvolta al passaggio da una forma enterica ad una forma sistemica con complicanze a livello di vari organi.

In Italia si contano circa 20 decessi associati a salmonellosi all'anno (20) generalmente in fasce d'età superiori ai 55 anni.

Gastroenteriti

Il processo patogenetico, riassunto in Figura 1, ha inizio subito dopo l'ingestione quando le salmonelle raggiungono il lume intestinale, si replicano, aderiscono agli enterociti e invadono la mucosa. Successivamente penetrano nelle cellule e vengono inglobati nei fagosomi; senza subire alcuna alterazione vanno a localizzarsi sulla lamina propria ed è a livello di questa struttura che si replicano rapidamente provocando un processo infiammatorio con congestione, edema e afflusso di polimorfonucleati e monocito-macrofagi.

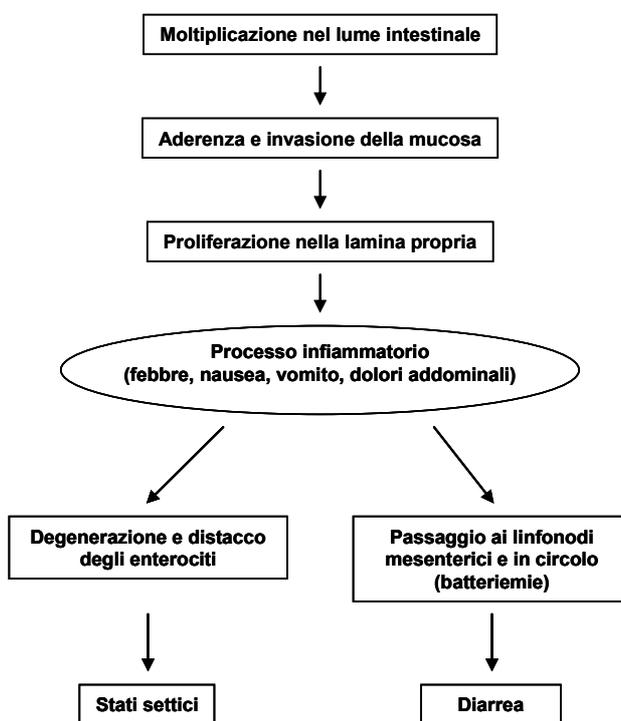


Figura 1. Processo patogenetico in infezioni da *Salmonella*

In questa prima fase la liberazione di lipopolisaccaride batterico provoca febbre, nausea, vomito e dolori addominali. Il vomito (alimentare, acquoso o biliare) è particolarmente intenso e precoce nel bambino piccolo. I dolori addominali possono essere diffusi o localizzati all'epigastrio. Dopo circa 10-20 h insorge la diarrea determinata sia dalla degenerazione e dal distacco degli enterociti che dalla loro sofferenza funzionale. Questa evoluzione bifasica della sintomatologia si riscontra nella maggior parte dei pazienti con gastroenterite da *Salmonella*. Le feci inizialmente molli e acquose, possono presentare nel secondo o terzo giorno di malattia tracce di muco misto a sangue (1, 21). I sintomi più frequenti sono la diarrea nel 50-100% dei casi, i dolori addominali nel 40-90%, la febbre nel 40-80%, nausea e vomito nel 20-50% e in circa il 50% dei pazienti con diarrea si è riscontrato del sangue nelle feci (22, 23, 24, 25).

La sintomatologia regredisce in 2-4 giorni e nella gran parte dei casi la guarigione è completa, ma il soggetto può rimanere portatore ed eliminare batteri con le feci.

Infezioni extraintestinali

Le forme sistemiche, che possono presentarsi come batteriemie, setticemie e infezioni localizzate, si sviluppano soprattutto nei bambini e in pazienti immunodepressi come conseguenza di gastroenteriti acute. A tali patologie sembrano essere associati in particolare alcuni sierotipi, come *S. Choleraesuis* e *S. Dublin* e in misura minore *S. Enteritidis* ed *S. Typhimurium* (26).

Il passaggio da una semplice enterite ad una forma sistemica è dovuto alla resistenza della *Salmonella* al *killing* fagocitario all'interno dei granulociti e dei monocito-macrofagi. I batteri trasportati dai fagociti possono passare ai linfonodi mesenterici e quindi in circolo inducendo semplici batteriemie sintomatiche o manifestazioni settiche con o senza localizzazioni metastatiche (Figura 1). La manifestazione di una forma sistemica dipende sia da fattori intrinseci del microrganismo sia dalle capacità difensive dell'ospite. Tali capacità sono poco efficienti nel neonato e nei pazienti immunodepressi, nei quali, come è noto, sono compromesse sia il fenomeno dell'opsonizzazione sia l'attività funzionale dei monociti e dei granulociti neutrofilici (1).

Manifestazioni cliniche dell'infezione negli animali

Le infezioni da *Salmonella* possono interessare sia gli animali a sangue caldo che a sangue freddo. Spesso sono asintomatiche, ma talvolta possono indurre malattia, principalmente a carico dell'apparato digerente. Alcuni sierotipi possono dare forme sistemiche come setticemia, aborto, o localizzarsi in vari organi. Come per l'uomo, la via principale di trasmissione è quella oro-fecale e le fonti più frequenti di contaminazione sono gli alimenti, le acque, l'ambiente. Per alcuni sierotipi, in particolare *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*, risulta particolarmente importante la trasmissione verticale che comporta, ad esempio nelle specie avicole, il passaggio dell'infezione dai riproduttori alla progenie. I soggetti asintomatici svolgono un ruolo importante nel mantenere l'infezione in allevamento. La diffusione della *Salmonella* è inoltre agevolata da fattori come le condizioni igieniche e il sovraffollamento dell'allevamento, condizioni di stress, il parto, infezioni virali concomitanti. In genere, gli animali giovani sono più sensibili degli adulti.

L'intero processo che porta alla gastroenterite si compone di tre fasi: la colonizzazione intestinale, l'invasione del rivestimento epiteliale e la perdita di liquido. Le salmonelle dopo

aver raggiunto i villi dell'ileo e del colon iniziano a moltiplicarsi, infettano le cellule e raggiungono la lamina propria dove continua la replicazione e dove avviene la fagocitosi e il trasporto ai linfonodi. La risposta infiammatoria indotta stimola la liberazione di prostaglandine che inducono a loro volta la liberazione di acqua nel lume intestinale. In generale, le manifestazioni cliniche sono diarrea, vomito, inappetenza, dolori addominali. A questi quadri clinici si associano anche innalzamento della temperatura, depressione, shock e, nei casi più gravi, la morte. Se le salmonelle riescono a passare nel circolo sanguigno, si ha setticemia e disseminazione in vari organi (cuore, polmoni, cervello, linfonodi, ecc.), con gravi manifestazioni cliniche associate.

I sierotipi e le manifestazioni cliniche associate all'infezione variano al variare della specie animale. Nei bovini i sierotipi di maggiore importanza sono *S. Dublin* e *S. Typhimurium*. Le enteriti da *S. Dublin* si manifestano nei vitelli di 3-6 settimane con febbre, anoressia, depressione, diarrea e morte in pochi giorni, mentre negli adulti l'infezione si presenta con febbre, diarrea emorragica, aborto al 6°-7° mese. La mortalità può essere elevata.

La salmonellosi ovicaprina è molto diffusa e i principali sierotipi responsabili sono *S. Dublin* e *S. Typhimurium*. L'infezione si presenta con astenia, diarrea, sete intensa e morte entro 24h. Nella pecora si ha inoltre l'infezione da *S. Abortusovis* che induce come unica manifestazione l'aborto.

Il principale sierotipo coinvolto nell'infezione dei suini è *S. Choleraesuis*, che può dare due diverse forme di malattia: la forma setticemica e la forma enterocolitica. La forma setticemica provoca morte improvvisa e si manifesta in animali con età inferiore a 4 mesi e raramente in individui adulti. La forma enterocolitica si manifesta fra lo svezzamento e il 4° mese con emissioni di feci liquide, febbre, anoressia e disidratazione. Frequente l'infezione con *S. Derby*, che ha in genere decorso asintomatico.

Negli equini i principali sierotipi sono *S. Abortusequi* responsabile di aborto ed *S. Typhimurium* responsabile di enterite.

Nell'infezione dei volatili sono implicati sia alcuni sierotipi ospite-specifici (*S. Pullorum*, *S. Gallinarum*) che altri non adattati all'ospite (*S. Typhimurium*, *S. Blockley*, ecc.). *S. Pullorum* è l'agente eziologico della pullorosi (diarrea bianca bacillare), colpisce soprattutto il pollo ma è stata segnalata anche in tacchini, anatre, piccioni, faraone, fagiani e vari uccelli selvatici. Anche se la malattia può essere contratta a qualsiasi età, la probabilità che l'animale sia contagiato diminuisce con l'età. L'infezione si trasmette per lo più per via verticale, per deposizione di uova infette da parte di galline portatrici o per via inalatoria. I soggetti che sopravvivono rimangono portatori e possono contaminare l'ambiente. *S. Gallinarum* è l'agente della tifo del pollo e del tacchino, è rara nel pulcino, anche se la trasmissione può avvenire attraverso l'uovo. Il contagio avviene per mezzo della contaminazione di acqua e alimenti da parte dei soggetti portatori o ammalati.

Le infezioni con altri sierotipi possono manifestarsi come enteriti, o nei casi più gravi con setticemia nei pulcini nelle prime due settimane di vita (paratifo aviario). La mortalità varia da pochi casi a circa l'80% degli infetti. La trasmissione ai pulcini di *S. Enteritidis*, e più raramente di *S. Typhimurium* può avvenire per via verticale (infezione ovarica) mentre altri sierotipi danno l'infezione penetrando attraverso la porosità del guscio contaminato da feci infette.

Anche gli animali da compagnia sono soggetti ad infezione da *Salmonella*. Nei cani e nei gatti l'infezione si manifesta come un'enterite nei soggetti giovani. L'infezione è frequente nei rettili con decorso generalmente asintomatico e la problematica in questo caso è principalmente associata alla possibile trasmissione all'uomo.

ANTIBIOTICORESISTENZA

Il fenomeno dell'antibioticoresistenza è molto diffuso sia in isolati umani sia in ceppi provenienti da altre fonti (27). Alla base di questa elevata diffusione è il meccanismo del trasferimento orizzontale dei geni che conferiscono resistenza tra batteri dello stesso genere o di generi differenti. Il trasferimento avviene attraverso plasmidi, trasposoni e integroni che codificano per i geni di resistenza (cassette geniche) (28, 29). L'associazione tra cassetta genica e integrone ha acquisito nel tempo sempre maggiore importanza, soprattutto in relazione alla diffusione della multiresistenza (resistenza contemporanea a più antibiotici di diversa famiglia). Questo fenomeno è molto frequente in *Salmonella*, in particolare nel fagotipo di *S. Typhimurium* DT104 (STM DT104) (30, 31). Il profilo caratteristico di questo fagotipo è dato dalla resistenza ad ampicillina (Am), cloramfenicolo (C), streptomina (S), sulfonamidi (Su) e tetraciclina (Te) (R-type AmCSSuTe) i cui geni di resistenza sono localizzati in integroni. Recentemente in isolati di STM DT104 sono state segnalate resistenze ai fluorochinoloni e al trimetoprim (Tmp) in aggiunta al profilo suddetto. La resistenza ai fluorochinoloni, in particolare, è dovuta a mutazioni puntiformi nel gene *gyrA*, che codifica per la DNA girasi, uno degli enzimi importanti per la replicazione batterica (32, 33). Questo tipo di resistenza non può essere trasferita orizzontalmente ma può essere selezionata positivamente dall'uso di chinoloni anche in ambiti diversi da quello terapeutico umano. In conseguenza si è riscontrato un aumento di isolati umani resistenti alla ciprofloxacina (Cip) e ad altri chinoloni che si traduce in un rischio crescente di fallimenti terapeutici nei casi di infezione.

Il problema della multiresistenza non è una prerogativa di *S. Typhimurium*, viene osservato anche in altri sierotipi *S. Hadar*, *S. Blockley* e *S. Bredeney*, che presentano frequentemente resistenza a quattro o più antibiotici tra cui Am, Te, Su, spesso associati a resistenza verso fluorochinoloni (Cip) (31, 34, 35). *S. Enteritidis*, presenta in misura minore il fenomeno della resistenza multipla e mostra più frequentemente resistenza ad Am e acido nalidixico (Na) (35, 36).

Il fenomeno della multiresistenza in *Salmonella* può essere conseguenza dell'uso di antibiotici non solo in medicina umana, ma anche in medicina veterinaria e zootecnia. Le problematiche associate al settore veterinario sono i trattamenti di massa in allevamento intensivo per la terapia e la profilassi delle infezioni batteriche, con conseguente impossibilità di controllo accurato della posologia. Anche l'aggiunta di antibiotici ai mangimi in concentrazioni subterapeutiche, come promotori di crescita (auxinici), può aver favorito la selezione di ceppi resistenti sia verso le molecole impiegate sia verso quelle strutturalmente e farmacologicamente correlate (resistenza crociata). Una volta che il tratto intestinale degli animali viene colonizzato dai ceppi resistenti selezionati, questi vengono escreti attraverso le feci diffondendosi nell'ambiente e possono contaminare gli alimenti derivati. Queste considerazioni hanno portato nel 1999 al bando, in tutta la Comunità Europea, l'utilizzo come auxinici degli antibiotici (virginiamicina, avoparcina, tilosina, spiramicina e zincobacitracina) appartenenti a famiglie utilizzate nella terapia umana, al fine di evitare il fenomeno di resistenza crociata.

EPIDEMIOLOGIA DELLE INFEZIONI DA *SALMONELLA*

La trasmissione delle salmonelle all'uomo e in generale il loro ciclo biologico si presenta di notevole complessità in quanto coinvolge animali serbatoio, alimenti vettore e l'ambiente.

Serbatoi animali

Nel ciclo epidemiologico di *Salmonella* (Figura 2) gli animali fungono da principali serbatoi di mantenimento. Diversi sierotipi possono prediligere diverse specie animali; alcuni sono considerati specifici per una specie animale (*S. Gallinarum* nei polli), altri sono definiti ospite-adattati in quanto prediligono un ospite rispetto agli altri (*S. Dublin* per bovini, *S. Hadar* nei volatili, *S. Enteritidis* nelle galline ovaiole). Altri sierotipi sono invece ubiquitari come *S. Typhimurium*. Il ruolo di serbatoio viene svolto da numerose specie animali sia da reddito che da compagnia. I bovini sono spesso colonizzati da *S. Dublin* e *S. Typhimurium*, con infezioni di diversa durata e tipo di manifestazione clinica. *S. Dublin* può persistere nell'ospite molto a lungo, in alcuni casi anche tutta la vita, e spesso induce forme gravi di malattia. L'infezione da *S. Typhimurium* ha una durata generalmente inferiore ed è abitualmente associata ad enterite cronica (37, 38). Nelle specie aviarie sono presenti sierotipi specie-specifici, come *S. Gallinarum* nel pollo, sierotipi ospite-adattati e ubiquitari. In Italia, (dati ENTER-VET, 2002) i principali sierotipi ospite-adattati nel pollo sono *S. Hadar* e *S. Enteritidis*, mentre nel tacchino si ritrova principalmente *S. Blockley*. Anche i suini rappresentano un importante serbatoio di salmonelle come *S. Typhimurium* e *S. Derby* (39). Un ruolo di minore importanza nella diffusione delle salmonelle è rivestito dagli animali da compagnia. Particolarmente frequente la colonizzazione nelle tartarughe e altri rettili, spesso con sierotipi rari (40). Anche le specie selvatiche possono fungere da serbatoio, ma le informazioni relative sono piuttosto scarse.

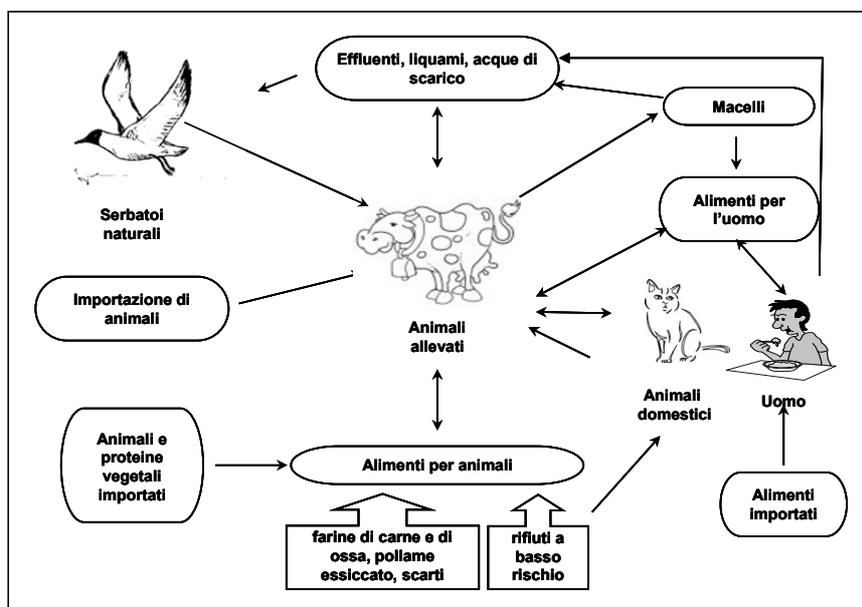


Figura 2. Ciclo di *Salmonella*

Vie di trasmissione

La trasmissione di *Salmonella* all'uomo avviene principalmente attraverso l'ingestione di alimenti di origine animale contaminati, anche se possono verificarsi casi di trasmissione interumana o per contatto diretto con gli animali (21). Ancora da chiarire il ruolo degli alimenti d'origine vegetale, che possono essere contaminati da *Salmonella* attraverso la dispersione delle deiezioni animali nell'ambiente. La contaminazione ambientale di suolo, acque superficiali, ambienti di lavoro, può favorire la diffusione e il contatto delle salmonelle con le specie animali recettive e con l'uomo.

Alimenti e derivati di origine animale

L'ubiquitarietà e la capacità di crescita delle salmonelle a temperature comprese fra 7 °C e 46 °C fa sì che qualsiasi alimento manipolato o conservato in modo non corretto possa essere fonte di infezione. Molti episodi sono causati dal tempo prolungato intercorso fra la preparazione o la cottura dell'alimento e il consumo trascorso, che rendono possibile la moltiplicazione dei batteri presenti, con aumento della dose infettante e quindi una maggiore probabilità di causare infezione, che può anche così presentarsi con caratteristiche di maggiore gravità. 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 (carni, uova) può causare un'estesa contaminazione ambientale che, anche in conseguenza dell'elevata capacità delle salmonelle di sopravvivere nell'ambiente, può essere causa di contaminazione e cross-contaminazione di alimenti pronti per essere consumati. È stato riportato un episodio epidemico dovuto a carne di tacchino contaminata da *S. Agona* e *S. Hadar*, che, dopo la cottura, era stato conservato a temperatura ambiente per alcune ore, e successivamente riscaldato (41).

Per quanto riguarda la catena di macellazione, la presenza di salmonelle 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. Per questo motivo tali prodotti, se cotti o stagionati in modo non sufficiente, 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 alle salmonelle l'opportunità di diffondere in modo estremamente rapido tra gli animali. La stessa condizione si ritrova durante il trasporto dall'allevamento al macello, che avviene sempre in condizione di sovraffollamento. Nel corso della macellazione, poi, le salmonelle possono passare da un carcassa all'altra, in seguito ai fenomeni di contaminazione crociata che si verificano durante la lavorazione.

Le uova e i prodotti derivati rappresentano un importante veicolo di *Salmonella*, soprattutto *S. Enteritidis*. 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. Negli ultimi due casi le salmonelle 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 delle salmonelle nelle uova viene facilitata dalla presenza di umidità sulla superficie delle uova stesse, che modifica la tensione superficiale. 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. 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 salmonelle 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. La maggior parte dei casi di tossinfezione alimentare da *S. Enteritidis* sono correlati non tanto alle uova, ma al consumo di prodotti a base d'uovo, quali maionese e dolci preparati con uova crude, in cui la moltiplicazione dei microrganismi presenti avviene in seguito al mantenimento dei prodotti a temperatura ambiente per tempi anche brevi, venendo a mancare quei fattori limitanti la crescita batterica che abbiamo descritto nelle uova in guscio.

Altri alimenti

Oltre ai più comuni alimenti, di origine animale, numerosi episodi di tossinfezione alimentare sono stati associati ad alimenti particolari. Basti ricordare l'episodio che si verificò in Inghilterra e nel Galles a causa di uno snack a base di mais contaminato da *S. Agona* (42) e quello causato da germogli di soia contaminati da *S. Saintpaul* (43). Anche prodotti a base di cioccolato, che in genere non creano particolari preoccupazioni grazie al loro basso tenore in acqua, hanno causato episodi rilevanti di salmonellosi; un esempio si è verificato negli anni settanta in Canada e negli Stati Uniti causato da *S. Eastbourne* (44), e altri legati alla presenza di *S. Napoli* in cioccolato di origine italiana (45, 46). 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.

Ambiente

Sebbene gli animali e gli alimenti di origine animale rappresentino gli ospiti principali delle salmonelle, esse sono riscontrate anche nell'ambiente (acque, suolo, alimenti di origine vegetale) grazie alla contaminazione attraverso le feci sia di origine umana che animale. 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 (47). 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 (48).

Anche gli animali al pascolo inducono una contaminazione diretta del suolo che, attraverso dilavamento della pioggia può trasportare la contaminazione fino ai bacini idrici (47).

PROFILASSI

La profilassi è un mezzo importante per limitare la diffusione delle infezioni da *Salmonella* nell'uomo. La complessità del ciclo biologico richiede che gli interventi in questo settore vengano svolti a livello di sanità animale, di sicurezza degli alimenti e di igiene pubblica. Una parte importante riguarda inoltre l'informazione e l'educazione dei consumatori.

L'introduzione di salmonelle in allevamento, come precedentemente riportato, può avvenire attraverso animali infetti, contaminazione ambientale come l'acqua, contatto con animali selvatici e domestici. Anche i mangimi rappresentano un importante fonte di infezione e le principali misure preventive nei confronti della loro contaminazione sono rappresentate dal controllo delle materie prime e dall'applicazione di rigide misure igieniche durante la loro preparazione.

È importante ricordare che l'efficacia del controllo non può prescindere da una corretta identificazione degli animali infetti, il che può creare alcuni problemi soprattutto nel caso di forme clinicamente non manifeste. Un approccio valido è quello di eseguire monitoraggi ambientali e sierologici, e di confermare le eventuali positività attraverso un accurato controllo microbiologico. Il livello igienico ha un ruolo rilevante nel controllo delle salmonelle in allevamento; disinfezioni periodiche, procedure di "tutto vuoto-tutto pieno" con pulizia dei locali destinati alla permanenza degli animali, possibilità di separazione tra gruppi, sono tutti fattori di profilassi diretta che limitano la diffusione. Le misure di profilassi diretta possono essere associate a misure di profilassi indiretta quali la vaccinazione degli animali, anche se l'efficacia di queste ultime risulta decisamente superiore nei confronti di sierotipi ospite-adattati (*S. Gallinarum* nel pollo) rispetto a quelli responsabili di tossinfezione alimentare nell'uomo. Gli animali, i polli in particolare, possono essere protetti nei confronti dell'infezione anche attraverso la somministrazione di flora enterica mista di animali adulti (flora competitiva). Per quanto riguarda la profilassi sugli animali la Comunità Europea ha deliberato una normativa per il controllo delle zoonosi (Direttiva 2003/99/CE e Regolamento (CE) 2160/2003) che assume una rilevante importanza poiché definisce prioritario ed espande il monitoraggio ai sierotipi prevalenti nell'uomo creando quindi l'esigenza di collegare i sistemi di sorveglianza attivi in campo umano e in campo veterinario. Il regolamento inoltre prevede la definizione di obiettivi di riduzione della prevalenza delle salmonelle in allevamento e la creazione di sistemi di monitoraggio, per seguirne l'andamento nel tempo e valutare il raggiungimento degli obiettivi prefissati nelle varie specie animali e categorie d'allevamento. Infine, questa normativa sancisce la responsabilità dei produttori come garanti della salubrità delle produzioni, introduce un approccio al controllo delle zoonosi basato sull'analisi costo/beneficio, sull'indagine epidemiologica dei focolai di tossinfezione alimentare e sullo scambio di informazioni fra autorità competenti.

Per quanto riguarda la sicurezza degli alimenti, gli interventi per ridurre il rischio di contaminazione devono essere effettuati lungo tutta la catena di produzione. In fase di macellazione, la prevalenza di animali infetti che entrano nella catena influisce direttamente sul livello di contaminazione delle carcasse. Oltre che con le misure di controllo applicate in allevamento questa prevalenza può essere ridotta anche riducendo la durata del trasporto verso lo stabilimento di macellazione e i tempi di sosta, al fine di diminuire lo stress, fattore che favorisce l'aumento del numero di animali escretori di salmonelle. Durante la macellazione, è indispensabile attuare tutte le misure atte a diminuire la contaminazione fecale delle carcasse, e particolarmente utile risulta l'applicazione di tecniche di programmazione della giornata lavorativa, che prevedano la macellazione dei gruppi *Salmonella* negativi durante le prime ore, e

di quelli positivi a fine giornata lavorativa. Un ruolo importante viene attribuito anche alle difficoltà di eliminare la presenza dei microrganismi dall'ambiente, durante le operazioni di pulizia e disinfezione che vengono eseguite dopo la macellazione di un gruppo di animali, e prima del ciclo successivo. L'importanza della contaminazione ambientale viene dimostrata anche dall'osservazione di come gli stipti di *S. Enteritidis* PT 4 che presentano maggiore capacità nell'infettare il pollo siano anche quelli con una maggiore resistenza nell'ambiente. Per quanto riguarda le specie avicole, l'elevata prevalenza di contaminazione nelle carcasse, ha portato allo studio di diversi metodi di decontaminazione, che si sono spesso dimostrati efficaci a livello sperimentale, ma in molti casi poco applicabili su vasta scala, in quanto estremamente costosi o con effetti negativi sulla qualità delle carni.

Un ulteriore fonte di contaminazione è il personale che opera nella filiera alimentare e che dovrebbe essere sottoposto a formazione per le normali pratiche igieniche. Accorgimenti quali lavarsi accuratamente le mani prima di toccare gli alimenti in preparazione, evitare la contaminazione crociata mantenendo separate le carni crude da quelle cotte, lavare accuratamente tutti gli utensili utilizzati e infine non lavorare a contatto con gli alimenti se si è in corso di infezione da *Salmonella* sono misure utili per ridurre il rischio di diffusione.

In conclusione, poiché la *Salmonella* è un germe ubiquitario e quindi di difficile eradicazione, le misure da adottare per arginare la sua diffusione negli animali e nell'uomo sono ad ampio spettro. La profilassi, in associazione al controllo, consente di ottenere risultati rilevanti nella riduzione della diffusione del batterio. Queste attività hanno un valido supporto dalla sorveglianza che consente di poter evidenziare settori critici e di seguire nel tempo l'evoluzione delle infezioni, dei sierotipi e di particolari fagotipi. Inoltre non va dimenticata l'educazione sanitaria e alimentare e la maggiore sensibilizzazione del pubblico sulla conservazione e l'utilizzo degli alimenti.

METODI DI LABORATORIO: ISOLAMENTO E IDENTIFICAZIONE

Isolamento

Isolamento da campioni di origine umana

L'isolamento delle salmonelle può essere effettuato da campioni di feci e/o di sangue, mentre risulta casuale il loro riscontro in altri tipi di campioni clinici come urina, liquido peritoneale ecc. L'esame del sangue (emocoltura) viene effettuato seguendo le più comuni tecniche adottate nella routine e non presenta particolari difficoltà, mentre l'esame dei campioni fecali (coprocoltura) può essere complesso per la grande varietà dei batteri presenti. A causa di tale problematica l'iter diagnostico (Figura 3) è differenziato: nei casi di salmonellosi acuta in cui la carica batterica di *Salmonella* è elevata si può fare una semina diretta del campione su terreni selettivi e/o differenziali, altrimenti si può procedere a seminare il campione in terreni liquidi di arricchimento per *Salmonella* contenenti agenti selettivi come Selenito di Sodio (brodo al selenito), Tetratonato di Sodio (Müller-Kauffmann Medium) (Appendice A).

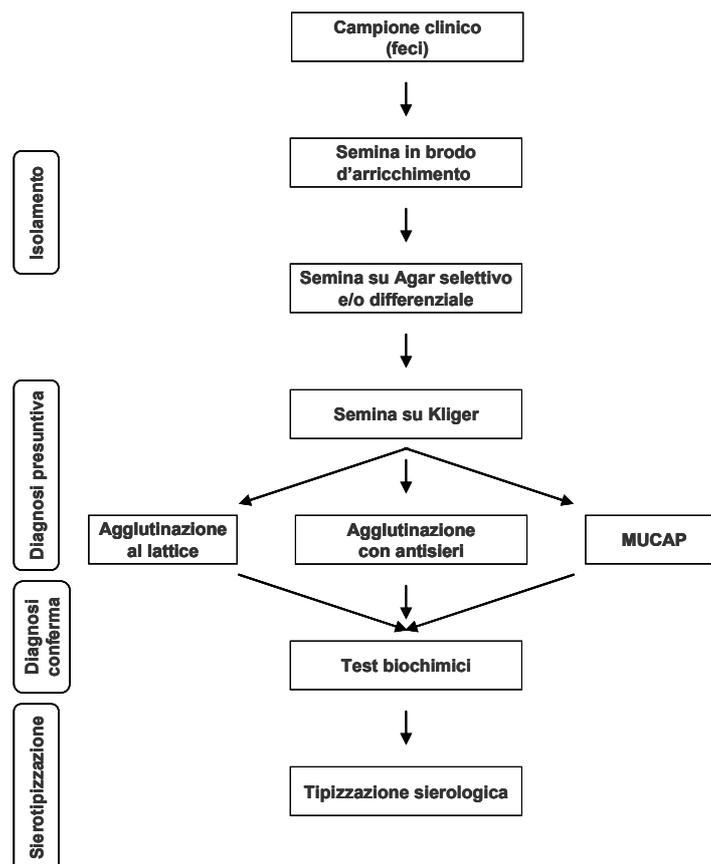


Figura 3. Schema di diagnosi nell'uomo per la ricerca di *Salmonella* da campione di feci

Dopo incubazione a 37 °C per 12-16 ore nel caso di brodo al selenito e 18-24 nel caso del Müller-Kauffmann, si procede alla semina su terreni agarizzati. I terreni più utilizzati possono essere suddivisi in moderatamente selettivi come l'Hektoen Enteric agar o l'agar *Salmonella-Shigella* e in altamente selettivi come il Desossicolato Citrato agar, il Bismuto-Solfito agar o il verde brillante. Di solito si consiglia l'utilizzo di una coppia di terreni a diverso grado di selettività. Il riconoscimento delle colonie cresciute sulle piastre è sicuramente una fase critica della diagnosi poiché si possono sviluppare colonie non tipiche quindi non riconoscibili, oppure stipiti contaminati.

Isolamento da campioni di origine animale

In generale la ricerca di *Salmonella* da campioni di origine veterinaria viene effettuata a partire da diverse matrici: feci, organi e tessuti, tamponi rettali/cloacali sull'animale, oppure da tamponi ambientali, acqua, mangimi per evidenziare *Salmonella* nell'ambiente.

A seconda della matrice di partenza, le procedure operative di preparazione del campione sono differenti: per l'esame di feci si diluiscono 25 g di campione in 225 mL di acqua peptonata (APTS), mentre i tamponi rettali, cloacali e ambientali vengono posti in 10 mL di APTS. L'isolamento da organi e tessuti viene effettuato ponendo 10 g di campione in 90 mL di APTS. Per la ricerca nell'acqua, si inoculano 25 mL di campione in 225 mL di APTS. Dalle uova scarto di schiusa, tramite una pipetta sterile o un tampone, si preleva una quantità di materiale che viene inoculato in APTS in rapporto 1:10. Per l'analisi dei mangimi si seminano 50 grammi di campione in 450 mL di APTS.

Le modalità operative per le fasi successive rispecchiano quanto riportato nel paragrafo successivo relativo alla ricerca negli alimenti. Generalmente si utilizza un solo terreno di arricchimento selettivo, il *Rappaport Vassiliadis Soy Broth*.

La procedura ISO 6579 per la ricerca di *Salmonella* spp. negli alimenti è attualmente in fase di revisione, e si prevede l'inserimento di un allegato relativo alla ricerca in campioni di origine animale. Tale allegato prevederà l'utilizzo di un terreno semisolido (*Modified Semisolid Rappaport Vassiliadis*, MSR_V) come unico arricchimento selettivo. Tale procedura prevede che si depositino tre gocce della coltura di prearricchimento in punti separati (e lontani tra di loro) della superficie di una piastra di terreno MSR_V senza spatolare. Le piastre vengono incubate, non rovesciate, a 42 °C ± 1 °C per 20-24 ore. Dopo incubazione si possono osservare, intorno ai punti di deposizione delle gocce, eventuali aloni di crescita (il colore azzurro del terreno appare leggermente rischiarato): essi sono dovuti a batteri mobili che si riproducono bene nel terreno; gli aloni dovuti a sviluppo di salmonelle sono di grandi dimensioni e spesso intercettano il bordo della piastra. La semplice osservazione di un tale alone conferisce alla prova una presuntività di presenza di salmonelle, mentre l'assenza di aloni o la presenza di aloni molto ristretti permette di escludere la presenza di salmonelle mobili.

Isolamento da alimenti

La ricerca di salmonelle negli alimenti è una procedura di controllo prevista dalla normativa per la sicurezza degli alimenti e viene effettuata seguendo procedure operative standard (POS) che si basano su metodi validati dall'*International Standard Organization* (ISO).

Il metodo ufficiale (49) prevede quattro fasi (Figura 4): pre-arricchimento, arricchimento, isolamento, identificazione e conferma. Operativamente, 25 g di campione vengono inoculati in 225 mL di brodo di pre-arricchimento non selettivo (acqua peptonata tamponata) con successiva omogeneizzazione e incubazione a 37 °C per 16-20 ore. Se la quantità di campione è inferiore a

25 g si impiega la necessaria quantità di terreno per ottenere una diluizione 1/10 (m/v) del campione. La seconda fase prevede la semina contemporanea di 1 mL di pre-arricchimento in 10 mL di brodo di arricchimento (Müller-Kauffmann Medium con novobiocina- MKTTn) con incubazione a 37 °C per 21-27 ore e 0.1 mL in 10 mL di *Rappaport Vassiliadis Soy Broth* (RVS) con incubazione a 41,5 °C per 21-27 ore. Le brodoculture ottenute vengono in seguito seminate su terreni agarizzati selettivo - differenziali (XLD Agar + un secondo terreno a scelta, quale Agar Verde Brillante (BGA) o altro) e incubati a 37 °C per 24 ore. Le colonie sospette (una per piastra, e ulteriori quattro in caso di negatività della prima) vengono purificate su nutrient agar a 37 °C per 18-24 ore e sottoposte a test analoghi a quelli usati nella ricerca di *Salmonella* dai campioni clinici.

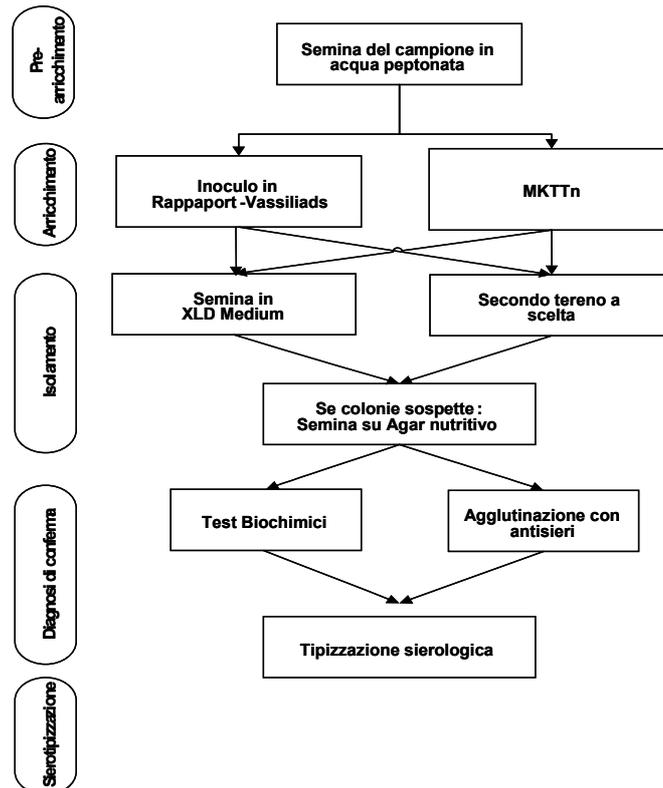


Figura 4. Schema di ricerca di *Salmonella* negli alimenti

Per la ricerca di *Salmonella* spp. nei molluschi bivalvi, il Decreto 31 luglio 1995 (GU 29/11/1995 n. 279) prevede l'utilizzo del *Modified Semisolid Rappaport Vassiliadis* (MSRV) come unico terreno di arricchimento selettivo.

Isolamento da campioni ambientali

La ricerca di *Salmonella* in habitat ambientali, acque superficiali, impianti di depurazione, acque ad uso potabile e liquami in genere, è regolamentata da opportuna legislazione e rientra nell'attività di controllo microbiologico generale delle acque che siano di balneazione (fiumi,

laghi, mare), destinate al consumo umano o reflue da riutilizzo. Tutte le acque destinate al consumo umano sono regolamentate dal DL.vo del 2 febbraio 2002 n. 27 mentre le acque reflue destinate al riutilizzo dal Decreto del 12 giugno 2003 n. 85 che indicano come valore la completa assenza degli enterobatteri patogeni.

I controlli delle acque di balneazione sono definiti dal DPR 470/1982; in particolare le modalità di prelievo sono descritte nell'allegato 2 e nella Circolare del Ministero della Sanità del 19/02/1991 "Qualità delle acque di balneazione - Norme di comportamento". Le determinazioni microbiologiche sono effettuate dai Dipartimenti Tecnici (Aree analitiche) delle Sezioni provinciali dell'ARPA. Per la ricerca e la conta degli indicatori di inquinamento fecale nell'acqua di mare sono disponibili due metodi, uno detto metodo *Most Probable Number* (MPN) e l'altro detto metodo a Membrane Filtranti (MF). Il metodo MF rispetto al metodo MPN prevede tempi minori e maggiore praticità di esecuzione. La tecnica MF si serve di sistemi filtranti sterilizzabili o monouso equipaggiati con filtri a membrana realizzate in genere in acetato di cellulosa o nitrato di cellulosa oppure policarbonato, con diametro di 50 mm e porosità di 0,45 µm. Dopo filtrazione ogni microrganismo trattenuto dal filtro dovrebbe produrre una colonia se posto in presenza di un adatto terreno di coltura; questa ipotesi non è sempre vera perché la presenza di più batteri a contatto fra loro può generare una sola colonia visibile (pseudocolonia), pertanto si parla di Unità Formanti Colonia. A filtrazione avvenuta la membrana con apposite pinzette viene posta su piastre con terreni solidificati o su tamponi disidratati di terreno reperibili in commercio e reidratati al momento. Usando terreni differenziali o selettivi e incubando le piastre a temperature opportune è possibile selezionare i microrganismi voluti presenti in un campione polimicrobico quale l'acqua di mare. Dopo incubazione in termostato le piastre appariranno più o meno ricche di colonie di batteri. Si può procedere alla conta delle colonie cosicché dividendo il numero di colonie contate per il volume filtrato avremo il numero di CFU per millilitro.

Identificazione

Le fasi successive di identificazione prevedono una fase presuntiva e una fase di conferma. Durante la fase diagnostica presuntiva vengono effettuati test biochimici tradizionali come la crescita su Kligler's Iron agar o su Triple Sugar Iron agar a cui seguono test di agglutinazione al lattice, agglutinazione su vetrino con antisieri, test biochimici rapidi (MUCAP Test) (Appendice B). La semina su Kligler's Iron agar a becco di clarino consente un primo orientamento poiché fornisce indicazioni sulla produzione di gas, di H₂S e sulla fermentazione del glucosio e del lattosio. La fase diagnostica di conferma prevede lo studio biochimico completo dello stipite utilizzando test tradizionali e vari sistemi disponibili in commercio. Secondo il "Manual of Clinical Microbiology" sono necessarie circa ventotto prove biochimiche per identificare tutte le specie appartenenti alla famiglia delle Enterobacteriaceae. Tali test possono essere suddivisi in due grandi gruppi; il primo comprende prove che consentono un'identificazione a livello di famiglia e in alcuni casi anche di specie come il test per l'ureasi, il test del Voges-Proskauer, la mobilità e quelle già descritte con il Kligler's Iron agar. Nel secondo gruppo sono compresi principalmente test di fermentazione dei carboidrati, il test di idrolisi dell'orto-nitrofenil-galattopiranoside (ONPG) e quello per lo sviluppo in presenza di KCN. Oggi tutti questi test possono essere fatti contemporaneamente utilizzando sia metodi biochimici manuali (Enterotube, Api 20E, Minitek), sia sistemi automatizzati (*Sceptor System*, Vitek, Phoenix). Tutti gli isolati di *Salmonella* confermati possono essere ulteriormente caratterizzati mediante tecniche di tipizzazione.

Tipizzazione sierologica

La tipizzazione sierologica viene effettuata mediante agglutinazione, con metodica rapida su vetrino o lenta in provetta. Entrambe le metodiche si applicano per l'identificazione degli antigeni somatici O e degli antigeni flagellari H, nonché dell'antigene di virulenza Vi. La scelta del metodo dipende dalle esigenze del laboratorio: il metodo dell'agglutinazione rapida è veloce e apparentemente più semplice, ma richiede una certa abilità ed esperienza dell'operatore, mentre, il metodo dell'agglutinazione lenta è più complesso e dispendioso ed è consigliabile se il laboratorio tratta costantemente un numero programmabile di tipizzazioni.

La tipizzazione prevede operativamente le seguenti fasi:

1. Agglutinazione somatica O
2. Agglutinazione flagellare H (prima agglutinazione)
3. Separazione, eventuale, tra fase 1 e fase 2
4. Agglutinazione flagellare H (seconda agglutinazione)

Vista la numerosità di sierotipi presenti nello schema di Kauffmann-White (6) si consiglia prima di addentrarsi in queste tecniche, di valutare in base alle risorse disponibili nel laboratorio, il livello di tipizzazione che si vuole raggiungere. È importante inoltre fare alcune considerazioni, se ci riferiamo ad isolati da campioni umani basterebbe utilizzare gli antisieri specifici per i sierotipi più frequentemente implicati nella patologia umana che, rispetto la grande quantità esistente sono in numero limitato. Lo stesso *WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella* ha definito che, in generale, i principali sierotipi isolati sono quelli appartenenti ai gruppi O4, O7, O8, O9, O3,10, O1,3,19 e con fase ciliare b, d, i, E, G, k, y, L, r, z10, z29 e 1; inoltre se abbiamo ad esempio isolati appartenenti al gruppo O4 e O9, si può ipotizzare che i sierotipi siano *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis*, rispettivamente.

Accorgimenti per ottenere un miglior risultato sono l'utilizzo di colture fresche per ottenere una migliore agglutinazione e il passaggio su una piastra di agar nutriente semisolido in quanto le colture vecchie possono perdere la mobilità; dopo incubazione a +37 °C, con la piastra posizionata in modo da avere il coperchio rivolto verso l'alto, si preleva per il test la patina batterica dalla parte periferica della piastra stessa.

La tecnica di agglutinazione veloce su vetrino prevede l'uso di batteri trapiantati da terreni nutritivi come il Tryptose Agar. Operativamente si pone una goccia di antisiero su un vetrino e poi con la punta dell'ago, si procede a trasportare la patina batterica direttamente sulla goccia di siero e si mescola con movimento circolare, in modo da disperdere i batteri. La patina microbica viene stemperata dalla periferia della goccia verso il centro fino ad inglobare tutto il siero. La miscelazione viene completata con movimenti di oscillazione del vetrino. Dopo qualche minuto si osserva la reazione ad occhio nudo mediante una lente concava e, nel caso di reazione positiva, si osserveranno piccoli granuli bianchi, omogeneamente dispersi nell'intera goccia di siero, divenuta trasparente attorno alle granulazioni. In caso di reazione negativa i batteri rimangono in sospensione con un aspetto lattiginoso e opaco.

Lo schema di identificazione più comunemente applicato (50, 51) prevede l'uso iniziale di sieri polivalenti che forniscono delle indicazioni generali e, successivamente, di sieri monovalenti specifici nei confronti sia degli antigeni somatici O sia degli antigeni flagellari H.

Operativamente le fasi sono:

1. saggio delle colonie con antisiero polivalente somatico O (A-S);
2. saggio delle colonie con antisiero monovalente somatico O;
3. saggio delle colonie con antisiero polivalente flagellare H (poli H fasi 1 e 2);
4. saggio delle colonie con antisiero monovalente flagellare.

Una completa definizione del sierotipo prevede, se si tratta di *Salmonella* bifasica, il riconoscimento di entrambe le fasi ciliari 1 e 2 che non possono essere evidenziate

contemporaneamente durante la prima agglutinazione, per cui si procederà ad effettuare la cosiddetta “inversione di fase”. I metodi più conosciuti sono quello di Swen

Gard e il metodo di Craigie. Il primo consiste nel seminare il ceppo al centro di una piastra contenente un terreno nutritivo agarizzato semisolido (Swen Gard), addizionato con una piccola quantità di siero anti-*Salmonella* corrispondente alla fase H conosciuta (e quindi da inibire). Dopo incubazione a 37 °C per 18-24 ore, la *Salmonella*, essendo mobile, si svilupperà formando una patina batterica di forma circolare, alla cui periferia saranno presenti cellule batteriche dotate di fase sierologica H differente da quella iniziale (passaggio da fase 1 a fase 2 o viceversa).

Il metodo di Craigie segue lo stesso principio del precedente ma viene effettuato in provetta.

Dopo aver ottenuto l’inversione di fase si ripete l’agglutinazione con gli antisieri H.

Nel metodo dell’agglutinazione lenta per la ricerca degli antigeni H, ogni ceppo viene seminato in due provette, contenenti rispettivamente 3 mL di *Trypticase Soy Broth* (TSB) per la ricerca della fase “H”, e 4 mL del medesimo terreno per la ricerca della fase “O”. La provetta contenente 3 mL viene incubata a 37 °C per 18-24 ore, e successivamente addizionata con un ugual volume di soluzione fisiologica formolata all’1%. La provetta contenente 4 mL viene incubata a 37 °C per 3 ore, e successivamente sottoposta ad inattivazione mediante bollitura.. Si procede quindi al test di agglutinazione lenta in piastra, utilizzando per ogni siero la diluizione d’uso precedentemente stabilita testando ceppi di riferimento con diluizioni scalari dei diversi sieri. Per tale prova esistono dei pool di sieri introdotti da Spicer-Edwards (6) che consentono, mediante varie combinazioni, di risalire a 35 fattori antigenici (Tabella 5).

Tabella 5. Rappresentazione degli antigeni flagellari H ottenuti mediante i pool di sieri di Spicer-Edwards

Antigeni H	Pool 1	Pool 2	Pool 3	Pool 4
a	+	+	+	-
b	+	+	-	+
c	+	+	-	-
d	+	-	+	+
e, h	+	-	+	-
G Complex*	+	-	-	+
j	+	-	-	-
k	-	+	+	+
r	-	+	-	+
y	-	+	-	-
z	-	-	+	+
z4 Complex**	-	-	+	-
Z10	-	-	-	+
Z29	-	+	+	-

Antigene H	Nome del pool	Numero del pool
e, n, x, : e, n, z15	EN complex	5
l, v : l, w : l, z13; l, z28	L complex	6
1,2 ; 1,5 : 1,6 ; 1,7 : z6	1 complex	7

* comprende gli antigeni f, g; f, g, s; f, g, t; g, m; g, m, q; g, m, s; g, m, t; g, p; g, p, s; g, p, u; g, q; g, s, t; g, t, m, p, t, u; m, t

** comprende gli antigeni z4, z23; z4, z24; z4, z32

Tipizzazione fagica

Se si ha l'esigenza di confrontare ceppi appartenenti allo stesso sierotipo e/o di effettuare indagini epidemiologiche, si ha la necessità di applicare tecniche molto più specifiche della sierotipizzazione. La fagotipizzazione permette infatti di differenziare i vari sierotipi in sottotipi (fagotipi) in base alla diversa sensibilità nei confronti di un pannello di batteriofagi. Questa tecnica sfrutta la caratteristica che hanno alcuni batteri di possedere recettori specifici per determinati fagi sierotipo specifici che, quindi, possono penetrare, replicarsi nella cellula e indurre la lisi. La modalità di esecuzione e di interpretazione della tecnica può basarsi su diversi schemi ma, quelli più comunemente utilizzati sono quelli indicati dal *Public Health Laboratory Service*, Colindale, Londra (52). È sicuramente una metodica molto utile ma ha come svantaggio quello di dipendere molto dalla capacità interpretativa dell'operatore ed è quindi anche di difficile standardizzazione. Inoltre, i reagenti non sono in commercio, e solo presso i laboratori di riferimento nazionali è possibile effettuare la fagotipizzazione.

Operativamente l'isolato viene seminato su piastre di *Trypticase Soy Agar* (TSA) e incubato a 37 °C per 18-24 ore. Successivamente si trasferisce con un'ansa la patina batterica in 4 mL di *Nutrient Broth Double Strength* (DIFCO) e si incuba per 2 ore a 37 °C. Contemporaneamente si trasferiscono i fagi opportunamente diluiti in micropiastre. Le brodocolture vengono seminate su piastre di *Nutrient Agar* (DNA), a cui vengono aggiunti i fagi in modo da formare delle gocce ben delimitate. Le piastre di DNA inoculate vengono incubate a 37 °C per 18-24 ore. Alla fine dell'incubazione si effettua la lettura. La presenza di lisi in corrispondenza del fago viene evidenziata mediante la formazione di una placca circolare in cui manca la patina batterica, o dalla presenza di placche di numero e dimensioni variabili in caso di lisi incompleta. La lettura e l'interpretazione dei risultati viene effettuata secondo lo schema proposto dall'*International Phage-typing Reference Laboratory* (Health Protection Agency, London, UK).

Tipizzazione molecolare

L'utilizzo di metodiche molecolari consente, mediante il confronto del DNA, di capire se isolati di *Salmonella* possono derivare dallo stesso clone cellulare. Tra le tecniche più diffuse ricordiamo l'analisi dei profili plasmidici, l'analisi ribosomale, l'AFLP (*Amplified Fragment-Length Polymorphism*) o la sua versione fluorescente la fAFLP e la VNTR (*Variable Number of Tandem Repeats*). Un enorme aiuto alle indagini epidemiologiche nel campo della microbiologia degli alimenti è quello fornito dalla tecnica dell'impronta del DNA (o DNA *fingerprinting*) mediante la metodica PFGE (*Pulsed-Field Gel Electrophoresis*).

Il DNA viene frammentato grazie ad endonucleasi di restrizione e poi corso su un gel d'agarosio per separare i frammenti originati e misurarne così il numero e la dimensione. Quello che si ottiene è un profilo di restrizione unico per ciascun clone, costituito da bande evidenziate mediante fluorescenza dalla colorazione con etidio bromuro. Tale profilo di restrizione permette l'individuazione univoca del ceppo esaminato e il confronto con profili ottenuti da altri ceppi della stessa specie. Il più comune metodo di separazione di molecole di DNA da 0,1 Kb a 30 Kb è il gel-elettroforesi orizzontale. Questa tecnica prevede il caricamento dei campioni di DNA su un gel d'agarosio a diverse concentrazioni e utilizza un campo elettrico continuo e omogeneo che obbliga il DNA, carico negativamente in quanto acido, a spostarsi, in presenza di una soluzione acquosa, verso il polo positivo. Poiché tutte le molecole di DNA hanno uno stesso rapporto carica/massa, saranno le caratteristiche del gel a determinare la velocità di migrazione del DNA e quindi il grado di separazione tra molecole piccole e grandi.

Quando la misura del DNA è al di sopra delle 30 Kb, si utilizza l'elettroforesi su gel in campo pulsato (*Pulsed-Field Gel Electrophoresis* o PFGE). Tale tecnica ideata da Schwartz e Cantor nel

1983 utilizza invece due campi elettrici con differenti angolazioni, applicati alternativamente al gel di agarosio per periodi di tempo definiti, dell'ordine di secondi. L'azione del primo campo causa uno stiramento lungo il piano orizzontale delle molecole di DNA e il loro movimento nel gel. L'interruzione di questo campo e l'azione del secondo fa sì che le molecole si muovano nella nuova direzione. Tenendo presente che per una molecola a catena lunga lineare esiste una relazione tra il cambiamento conformazionale indotto da un campo elettrico e la lunghezza della molecola stessa, le molecole più piccole si riallineranno più velocemente nel nuovo campo elettrico e quindi continueranno a muoversi attraverso il gel. Molecole più grandi al contrario impiegheranno più tempo per allinearsi. Variando continuamente la direzione del campo elettrico sarà quindi possibile separare le molecole quelle più piccole da quelle più grandi. La PFGE permette di separare frammenti di DNA fino a 10 Mb.

La tecnica prevede l'utilizzo di terreno liquido o piastra di TSA (*Tryptone Soya Agar*) su cui vengono fatti crescere gli isolati; le cellule batteriche vengono raccolte direttamente dalle piastre oppure centrifugate e lavate per eliminare eventuali sedimenti. Successivamente vengono risospese in CSB (*Cell Suspension Buffer*: 100mM Tris, 100mM EDTA, pH 8) sino ad ottenere una densità cellulare di 0,38-0,44 O.D. (unità di densità ottica) a 450 nm.

Poiché il DNA cromosomico può danneggiarsi facilmente, le cellule batteriche vengono inglobate in una matrice d'agarosio a forma di blocchetti. Praticamente si prepara un gel d'agarosio all'1,6% o al 2% in TE (10mM Tris, 1mM EDTA, pH 8) e si lascia scendere la temperatura del gel fino a 50 °C. Contemporaneamente si aggiunge nella sospensione cellulare Proteinasi K alla concentrazione finale di 0,5 mg/mL e si mescola con l'agarosio in modo da ottenere un rapporto 1:1; si cola in uno stampo e si lascia solidificare. Ogni blocchetto d'agarosio che adesso contiene le cellule batteriche viene lasciato per almeno 2 ore in una soluzione di lisi (50mM Tris, 50mM EDTA, 1% Sarkosyl, 0,1 mg/mL Proteinasi K, pH8) all'interno di un bagnetto a 54 °C. Il blocchetto d'agarosio con le cellule incluse viene quindi lavato due volte utilizzando acqua distillata sterile alla temperatura di 50 °C; mentre il terzo lavaggio viene effettuato in TE alla stessa temperatura. I blocchetti così ottenuti possono essere conservati per molti mesi a 4 °C per successive analisi. Quando si vorrà procedere all'analisi del DNA, uno dei tasselli conservati dello spessore di 3 mm viene posto a contatto con 50-100 µl di una soluzione contenente buffer di reazione e 0,2-0,8 U/ µL dell'enzima XbaI. Si lascia a 37 °C per almeno 4 ore. Si prepara un gel d'agarosio all'1% o all'1,2% usando TBE 0,5X e si caricano i campioni facendoli correre a determinate condizioni: 6V/cm (200V), *pulse time* 2-64 s, tempo di corsa dalle 18 alle 22 ore alla temperatura di 14 °C.

Le variazioni di *pulse time*, ossia nel tempo d'inversione del campo elettrico, influenzano la taglia delle bande che è possibile separare. Per esempio correndo il gel a 5,4 V/cm e con un *pulse time* di 90 s due frammenti di 1,5 Mb e 2,2 Mb appaiono come un'unica banda. Se invece lavoriamo con un tempo d'inversione di 120 s gli stessi due frammenti risulteranno separati.

Per visualizzare le bande il gel viene colorato con etidio bromuro e osservato al transilluminatore UV. Verrà scattata una fotografia che sarà utilizzata per l'analisi e l'interpretazione dei profili; verrà salvata in formato TIFF e i files analizzati con un programma informatico in grado di confrontare le diverse bande ottenute ed effettuare eventuali correlazioni tra i diversi ceppi in modo da capire se vi è una discendenza clonale.

Test di sensibilità agli antibiotici

La determinazione della sensibilità agli antibiotici consente di valutare l'efficacia in vitro di un farmaco nei confronti di un batterio permettendo così dal punto di vista clinico, di dare

informazioni sull'antibiotico più efficace da utilizzare in terapia e, dal punto di vista epidemiologico, di monitorare l'evoluzione della resistenza batterica.

I metodi utilizzabili sono molti ma al fine di rendere comparabili i risultati provenienti dai vari laboratori a livello mondiale, si preferiscono metodi standardizzati; i più diffusi sono quelli proposti dal *National Committee for Clinical Laboratory Standard* (NCCLS). Standardizzare significa rendere omogenei criteri di esecuzione quali: utilizzo di isolati puri, densità di inoculo, condizioni di incubazione, metodo di lettura. La standardizzazione di questi criteri consente infine l'interpretazione biologica e clinica del risultato.

I risultati di un test possono essere la Minima Concentrazione Inibente (MIC) definita come la minima concentrazione, in un range di diluizioni di antibiotico, che inibisce la crescita batterica; oppure in mm che misurano il diametro di un alone di inibizione.

I criteri di interpretazione dei risultati quantitativi si basano su *breakpoints*, (indicati e aggiornati dal NCCLS e altri) definiti in modo da distinguere tre categorie: sensibile, intermedio e resistente (S, I, R). La sensibilità di un batterio ad un antibiotico è definita come la capacità di un farmaco di inibire la crescita batterica al dosaggio considerato. I batteri che sono inibiti a dosaggi superiori sono considerati intermedi, mentre sono resistenti quelli non inibiti dall'antibiotico testato.

I test più comunemente usati possono essere suddivisi in due gruppi:

- test in agar diffusione (E-Test, Kirby Bauer);
- test in diluizione (in brodo, in piastra).

Il metodo della diffusione in agar valuta la capacità di un antibiotico, contenuto su dischi o su strisce, di inibire la crescita di un microrganismo su piastre di agar. Si tratta di un metodo semplice, rapido ed economico, ed è quello più comunemente usato. Risente ovviamente di numerose variabili che possono influenzare i risultati, quali:

- la preparazione dell'inoculo batterico;
- la composizione e il pH del terreno;
- il tempo e la temperatura di incubazione;
- la capacità di diffusione del farmaco.

I test in diluizione valutano la capacità di un antibiotico di inibire o meno a varie concentrazioni la crescita del microrganismo in esame. Con questo metodo è possibile valutare sia la MIC, sia la MBC (minima concentrazione battericida, cioè la minima concentrazione di farmaco che distrugge la totalità dei microrganismi in esame). Tale prova può essere eseguita in provetta con terreno liquido o in piastra con terreno solido. Il metodo è molto preciso e accurato, ma è di complessa attuazione pratica sia perché lungo e costoso sia perché influenzato da numerosi fattori:

- il terreno impiegato;
- le dimensioni dell'inoculo batterico;
- la velocità di crescita del microrganismo;
- il periodo di incubazione delle colture;
- la stabilità degli antibiotici saggiati.

Indipendentemente dal metodo usato, la validazione del risultato del test viene effettuata testando in ogni prova, contemporaneamente ai campioni da esaminare, anche i ceppi di riferimento idonei i quali devono fornire risultati entro i valori definiti dal sistema di standardizzazione utilizzato.

Metodo di diffusione in Agar (Kirby Bauer)

La metodica è la seguente:

- preparare una sospensione batterica in brodo di crescita (*Brain Heart Infusion*) partendo da tre o quattro colonie ben isolate;
- incubare in termostato a 37 °C fino a raggiungere una torbidità di 0,5 Mc Farland (1×10^8 CFU);
- seminare su piastra di agar mediante tampone sterile (tre volte roteando la piastra di 60°);
- deporre entro quindici minuti dalla semina i dischetti di antibiotico;
- capovolgere le piastre per evitare la condensa e incubarle a 37 °C per 16-18 ore;
- lettura dei risultati.

In base al numero di antibiotici da testare possono essere usate piastre tonde da 90 mm oppure quadrate da 120 mm (fino a 16 dischetti). La scelta del terreno dipende dal batterio da testare; in genere si usa MHA II mentre si aggiunge sangue per batteri esigenti come *Streptococchi* spp., *Mannhemia* spp. e altri. I dischetti sono impregnati di antibiotico a concentrazione nota, hanno un diametro di 6 mm e devono essere posti sull'agar ad una distanza di 15 mm dal bordo e di almeno 20 mm tra loro per evitare problemi nelle letture. Il risultato è la formazione di un alone di inibizione circolare il cui diametro, espresso in mm, può essere letto o manualmente tramite righello oppure in automatico con apparecchiature. Dal confronto dei diametri con i riferimenti riportati sul NCCLS, si definisce per ogni antibiotico la categoria del microrganismo, sensibile (S), intermedio (I), resistente (R). Difficoltà di interpretazione dei risultati possono essere legate a:

- crescita di colonie nell'alone di inibizione quali mutanti resistenti o colonie estranee dovute ad inquinanti, si consiglia di controllare il ceppo iniziale;
- presenza nell'alone di patina poco visibile dovuta non a fenomeni di resistenza ma principalmente al tipo di antibiotico e al batterio in esame (esempio per *Salmonella* Tmp, Su, Sxt);
- presenza di doppio alone che può essere dovuto sia ad inquinamento che ad eventuale semina su piastre umide, si consiglia di ripetere il test;
- presenza di aloni con contorno sfrangiato, può dipendere sia dal rapporto tra batterio e antibiotico che da una semina non corretta;
- patina non uniforme sulla piastra dovuta ad una semina non corretta, ripetere il test;
- presenza come nel caso di *Proteus*, di un sottile velo che può penetrare oltre la zona di inibizione, ignorare la sciamatura e considerare solo il margine esterno;
- sovrapposizione di aloni dovuti a diametri molto grandi, il test va ripetuto distanziando ulteriormente i dischetti.

SALMONELLOSI IN ITALIA E IN EUROPA

In Italia, le infezioni umane da *Salmonella* sono soggette a notifica obbligatoria al Servizio Sanitario Nazionale (SSN) (rientrano nella classe II della classificazione delle malattie infettive). I dati riportati nel Bollettino epidemiologico delle malattie infettive del Ministero della Salute (<http://www.ministerosalute.it/promozione/malattie/datidefcons.jsp>), mostrano la presenza di circa 10-15.000 casi di salmonellosi non tifoidee per anno e si stima che circa il 50% dei focolai epidemici di tossinfezione alimentare sia sostenuto da *Salmonella*. È importante evidenziare come in alcune regioni i casi di salmonellosi siano probabilmente molto sottostimati, come si può vedere dalle differenze di incidenza che nell'anno 2002 varia da 7,8 casi su 100.000 in Puglia fino a 70 casi su 100.000 nel Trentino Alto Adige.

Per quanto riguarda la mortalità causata da infezioni da *Salmonella*, i dati ISTAT riportano circa 20 decessi annui (ISTAT 1997-2001) e principalmente in soggetti anziani.

Gli episodi epidemici dovuti a tossinfezione alimentare, sono anch'essi soggetti a notifica obbligatoria (classe IV). Nel 2002, sono stati notificati 406 focolai epidemici di tossinfezione alimentare (Dati Bollettino Notifiche Malattie Infettive, MdS) ma i dati riportati non distinguono i focolai per agente eziologico, non è quindi possibile stabilire quanti di questi siano stati causati da *Salmonella*.

A livello internazionale sono state attivate diverse reti di sorveglianza delle salmonellosi. Il *World Health Organization* (WHO) in collaborazione con il *Center for Diseases Control and Prevention* (CDC) di Atlanta, l'Istituto Pasteur di Parigi e altre istituzioni, ha attivato un programma di sorveglianza internazionale chiamato *Global Salmonella Surveillance* (<http://www.who.int/salmsurv/en/>). Tale programma ha iniziato la sua attività nel gennaio 2000 e raccoglie dati annuali sugli isolamenti, i sierotipi, l'origine degli isolati e dati sul profilo di resistenza agli antibiotici.

In Europa, è attiva dal 1994 una rete di sorveglianza internazionale chiamata Enter-Net (www.enter-net.org.uk), che coinvolge centri di referenza dei Paesi dell'Unione Europea nonché il Canada, il Giappone, il Sud Africa, la Svizzera e la Norvegia. La rete Enter-Net raccoglie informazioni sui sierotipi di *Salmonella* e di *E. coli* STEC associate alle infezioni umane, sulla resistenza agli antibiotici dei ceppi implicati e contribuisce all'identificazione e allo studio di episodi epidemici a carattere internazionale. L'Istituto Superiore di Sanità partecipa alla sorveglianza Europea e coordina un sistema di sorveglianza nazionale, Enter-Net Italia (www.simi.iss.it/Enternet/index.asp), che coinvolge numerosi laboratori del SSN. Nel 2002 è stata attivata a livello nazionale una struttura parallela al sistema Enter-Net, che riguarda la raccolta di dati sugli isolamenti di *Salmonella* spp. da campioni di origine veterinaria, e che prende il nome di Enter-Vet. Le strutture che vi partecipano sono gli Istituti Zooprofilattici Sperimentali coordinati dal Centro Nazionale di Referenza per le Salmonellosi istituito presso l'Istituto Zooprofilattico delle Venezie (www.izsve.it).

Enter-Net raccoglie annualmente informazioni microbiologiche ed epidemiologiche su oltre 12.000 isolati di *Salmonella*, di cui circa la metà di origine umana e da informazioni su sierotipi, fagotipi (per *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*), e sulle resistenze ad un pannello di undici antibiotici.

I sierotipi isolati più frequentemente nell'uomo nel periodo 2001-2003 sono riportati in Tabella 6 (dati Enter-Net). In Italia negli anni 2000 *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis* hanno rappresentato oltre il 70% di tutti i sierotipi isolati dall'uomo. A partire dal 2001, *S. Typhimurium* è risultato in Italia il sierotipo più frequente, mentre a livello europeo *S. Enteritidis* continua ad essere il sierotipo più frequente nella maggior parte dei Paesi.

Tabella 6. Prevalenza dei principali sierotipi isolati dall'uomo negli anni 2000-2003 (dati Enter-Net)

Sierotipo	2000	2001	2002	2003
S. Enteritidis	41,2	25,5	28,4	36,9
S. Typhimurium	31,0	44,6	46,3	39,6
S. Infantis	7,3	6,4	3,1	1,9
Altri	20,5	23,5	22,2	21,6
Totale	5966	5707	5074	6178

I fagotipi più rappresentati tra i ceppi di *S. Enteritidis* isolati nel 2002-2003 sono riportati in Tabella 7. Come nel resto d'Europa, il fagotipo PT4 risulta essere il più frequente.

Tabella 7. Principali fagotipi di S. Enteritidis isolati nell'uomo (dati Enter-Net) nel periodo 2002-2003

Uomo	n.	%
PT4	61	23,6
PT14B	34	13,1
PT2	28	10,8
PT21	28	10,8
PT1	22	8,5
RDNC *	20	7,7
PT8	15	5,8
PT1B	5	1,9
PT4B	5	1,9
Altri fagotipi	27	10,4
nt **	14	5,4
Totale	259	100,0

* lettura non conforme allo schema

** non tipizzabile

Per quanto riguarda *S. Typhimurium* il fagotipo DT104 risulta essere il prevalente sia in Italia (Tabella 8) che nel resto d'Europa. Il 25% dei ceppi risulta non tipizzabile (NT) con il pannello utilizzato e fornito dall'HPA di Colindale.

Tabella 8. Principali FAGOTIPI di S. Typhimurium isolati nell'uomo (dati Enter-Net) nel periodo 2002-2003

Uomo	n.	%
DT104*	89	25,4
U302	56	16,0
RDNC**	30	8,6
DT120	14	4,0
DT193	14	4,0
DT195	7	2,0
DT208	7	2,0
Altri fagotipi	44	12,6
nt ***	89	25,4
Totale	350	100,0

* include i sottotipi 104L e 104H

** lettura non conforme allo schema

***non tipizzabile

Per quanto riguarda la sorveglianza sugli animali e sugli alimenti, si fa riferimento ai dati forniti dal sistema Enter-Vet (53, 54). La Tabella 9 riporta la prevalenza dei principali sierotipi isolati nelle varie specie animali e negli alimenti d'origine animale negli anni 2002 e 2003. *S. Typhimurium* è il sierotipo più ubiquitario, è isolata da tutte le specie animali considerate ed è prevalente tra i ceppi isolati da bovino e suino. Tra i ceppi isolati da tacchino prevalgono *S. Heidelberg*, *S. Blockley* e *S. Hadar*, frequenti anche nel pollo insieme a *S. Virchow*. *S. Enteritidis* viene isolata quasi esclusivamente dalle galline ovaiole e la nota difficoltà di isolamento spiega la disparità tra il numero relativamente ridotto di ceppi riportati e il gran numero di isolati umani.

Tabella 9. Prevalenza dei sierotipi di *Salmonella* negli animali e negli alimenti d'origine animale isolati negli anni 2002-2003 (dati Enter-Vet)

Sierotipo	Bovino	Suino	Tacchino	Pollo
<i>S. Typhimurium</i>	37,3	31,3	13,4	7,7
<i>S. Derby</i>	5,6	18,5	3,7	0,8
<i>S. Anatum</i>	3,2	5,0	8,0	0,6
<i>S. Blockley</i>	2,9	0,3	20,3	5,3
<i>S. Bredeney</i>	2,9	5,6	1,2	7,0
<i>S. Saintpaul</i>	2,9	0,1	5,6	3,0
<i>S. Give</i>	2,4	0,7	0,1	0,2
<i>S. Hadar</i>	2,1	0,3	11,4	18,4
1,4,5,12:i:-	1,9	8,7	0,5	0,7
<i>S. London</i>	1,9	3,3	0,1	-
<i>S. Enteritidis</i>	1,6	0,3	0,1	12,4
<i>S. Heidelberg</i>	1,1	0,3	21,0	12,7
<i>S. Panama</i>	1,1	1,7	-	-
<i>S. Agona</i>	1,1	0,6	3,6	0,9
<i>S. Senftenberg</i>	1,1	0,2	0,1	1,0
<i>S. Virchow</i>	0,8	0,2	0,2	14,1
<i>S. Livingstone</i>	0,5	2,3	0,5	10,3
<i>S. Infantis</i>	0,5	2,5	0,1	3,8
<i>S. Thompson</i>	0,5	-	-	0,9
<i>S. Brandenburg</i>	0,3	2,0	-	-
<i>S. Goldcoast</i>	0,3	1,4	0,1	-
<i>S. Rissen</i>	0,3	2,0	-	0,2
<i>S. Gallinarum</i>	-	-	0,4	4,2
<i>S. Kentucky</i>	-	-	-	1,1
<i>S. Kottbus</i>	-	-	0,8	0,2
<i>S. Indiana</i>	-	-	0,2	0,8
<i>S. Eimbuettel</i>	-	0,6	-	0,1
<i>S. Muenchen</i>	-	0,8	0,1	0,1
Altro	23,2	9,9	7,6	22,8
ni *	4,5	1,1	0,7	2,4
Totale	375	2633	841	2098

* non identificato

Il sistema Enter-Net Italia fornisce anche informazioni sulla resistenza agli antibiotici dei ceppi di *Salmonella* isolati e tipizzati. Precedenti indagini sulla prevalenza della resistenza agli antibiotici in salmonelle isolate in Italia hanno evidenziato come anche nel nostro Paese il problema dell'antibioticoresistenza sia rilevante (36, 55). La Tabella 10 riporta il numero dei ceppi di *Salmonella* resistenti a ciascuno degli 11 antibiotici del pannello previsto dal sistema di sorveglianza. La maggior parte degli isolati di *S. Enteritidis* (70,0%) risulta sensibile a tutti gli

antibiotici, mentre solo l'11,9% risultano resistenti a sulfonamide, 7,2% ad ampicillina, 6,7% a streptomina e 6,1% all'acido nalidixico. Per quanto riguarda *S. Typhimurium*, la maggior parte dei ceppi sono resistenti ad ampicillina (80,8%), streptomina (70,2%), tetraciclina (78,3%), sulfonamide (67,4%) e cloramfenicolo (28,2%). Come si può osservare le percentuali di ceppi, appartenenti ad altri sierotipi, resistenti agli antibiotici sono minori.

Tabella 10. Antibiotico resistenza in isolati da campioni umani di *Salmonella*
(n. ceppi resistenti/ totale ceppi saggiati) (%)

Antibiotici	S. Enteritidis		S. Typhimurium		Altri sierotipi	
Acido nalidixico	40/657	(6,1)	52/752	(9,6)	67/504	(13,3)
Ampicillina	68/939	(7,2)	902/1116	(80,8)	172/690	(24,9)
Cefotaxime	3/877	(0,3)	12/1099	(1,1)	3/642	(0,5)
Ciprofloxacina	1/1018	(0,1)	1/1283	(0,1)	1/720	(0,1)
Cloramfenicolo	19/722	(2,6)	262/929	(28,2)	39/565	(6,9)
Gentamicina	13/917	(1,4)	31/1093	(2,8)	22/657	(3,3)
Kanamicina	9/449	(2,0)	23/519	(4,4)	35/356	(9,8)
Streptomina	27/404	(6,7)	342/487	(70,2)	148/343	(43,1)
Sulfonamide	54/451	(11,9)	389/577	(67,4)	126/393	(32,1)
Tetraciclina	43/750	(5,7)	746/952	(78,3)	280/574	(48,8)
Trimethoprim	24/502	(4,7)	89/589	(15,1)	25/337	(7,4)

Considerazioni conclusive

La sorveglianza delle zoonosi e degli agenti zoonotici, in particolare delle salmonelle, è resa obbligatoria dalla direttiva 99/2003/CE, che rende inoltre obbligatoria anche la sorveglianza dell'antibioticoresistenza. Al fine di poter seguire l'andamento epidemiologico delle infezioni a trasmissione alimentare e l'andamento delle resistenze, sono quindi necessari sistemi di raccolta e analisi dei dati armonizzati ed efficienti, che a livello nazionale e internazionale consentano di avere le informazioni necessarie per definire l'entità del problema. Questi sistemi devono basarsi su metodiche microbiologiche ed epidemiologiche standardizzate, che rendano comparabili i dati raccolti. L'esempio di sistemi di sorveglianza quali Enter-Net sono estremamente positivi, in quanto attraverso un database comune e uniforme favoriscono lo scambio di informazioni tra i vari Paesi.

BIBLIOGRAFIA

1. Darwin KH, Miller VL. Molecular basis of the interaction of Salmonella with the intestinal mucosa. *Clinic Microbiol Rev* 1999;12(3):405-28.
2. Wallis TS, Galyov EE. Molecular basis of Salmonella-induced enteritis. *Mol Microb* 2000;36:997-1005.
3. Slauch J, Taylor R, Maloy S. Survival in a cruel world: how Vibrio cholerae and Salmonella respond to an unwilling host. *Genes Dev* 1997;11:1761-74.
4. BaumL er AJ, Tsolis RM, Heffron F. Fimbrial adhesins of Salmonella Typhimurium. *Adv Exp Med Biol* 1997;412:149-58.
5. Gunn JS, Ernst RK, McCoy AJ, Miller SI. Constitutive mutation of the Salmonella enterica serovar Typhimurium transcriptional virulence regulator phoP. *Infect Immun* 2000;68(6):3758-62.
6. Zavanella M. *Tipizzare le salmonelle*. Brescia: Fondazione Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche; 2001.
7. Lucas RL, Lostroh CP, DiRusso CC, Spector MP, Wanner BL, Lee CA. Multiple factors independently regulate hilA and invasion gene expression in Salmonella enterica serovar Typhimurium. *J Bacteriol* 2000;182:1872-82.
8. Tsolis RM, Kingsley RA, Townsend SM, Ficht TA, Adams LG, BaumL er AJ. Of Mice, calves and men. Comparison of the mouse typhoid model with other Salmonella infections. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 1999;473:261-74.
9. Martin GD, Chart H, Threlfall EJ. Invasiveness of Salmonella serotypes Typhimurium and Enteritidis of human gastro-enteric origin for rabbit ileum: role of LPS, plasmids and host factors. *J Med Microb* 2000;49:1011-21.
10. Sayers A, Whitt DD (Ed.). *Bacterial pathogenesis: a molecular approach*. Washington DC: American Society for Microbiology; 1991.
11. Miao EA, Miller SI. A conserved amino acid sequence directing intracellular type III secretion by Salmonella Typhimurium. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;13:7539-44.
12. Hueck CJ. Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol Mol Biol Rev* 1998;62(2):379-433.
13. Lucas RL, Lee CA. Unravelling the mysteries of virulence gene regulation in Salmonella Typhimurium. *Mol Microb* 2000;36:1024-33.
14. Ehrbar K, Friebel A, Miller SI, Hardt WD. 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. *J Bacteriol* 2003;185(23):6950-67.
15. Eckmann L, Rudolf MT, Ptasnik A. D-myo-Inositol 1,4,5,6-tetrakisphosphate produced in human intestinal epithelial cells in response to Salmonella invasion inhibits phosphoinositide 3-kinase signalling pathways. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:14456-60.
16. Wallis TS, Wood M, Watson P, Paulin S, Jones M, Gaylov EE. Sips, Sops, and Spis but not stn influence Salmonella enteropathogenesis. In: Paul PS, Francis DH (Ed.). *Mechanisms in the pathogenesis of enteric diseases*. New York: Kluwer Academic, Plenum Publishers; 1999. p. 275-80.
17. Oyston PCF, Dorrell N, Williams K. The response regulator PhoP is important for survival under conditions of macrophage-induced stress and virulence in Yersinia pestis. *Infect Immun* 2000;68:3419-25.

18. Browne SH, Lesnick ML, Guiney DG. Genetic requirements for Salmonella induced cytopathology in human monocyte derived macrophages. *Infect Immun* 2002;70(12):7126-35.
19. Fierer J, Guiney D. Diverse virulence traits underlying different clinical outcomes of Salmonella infection. *J Clin Investig*. 2001;107:775-80.
20. Istituto Nazionale di Statistica (ISTAT). *La mortalità per causa delle regioni italiane*. Roma, 1997.
21. Tauxe RV, Pavia AT. Salmonellosis: nontyphoidal. In: Evans AS, Brachman PS (Ed.). *Bacterial infection of humans: epidemiology and control*. New York: 3rd ed. Plenum Medical Book Co.; 1998. p. 613-630.
22. Bisbini P, Leoni E, Nanetti A. An outbreak of Salmonella Hadar associated with roast rabbit in a restaurant. *Eur J Epidemiol* 2000;16:613-8.
23. Van Duynhoven Y, Widdowson MA, Jager TF. Salmonella enterica serotype enteritidis phage type 4b outbreak associated with bean sprouts. *Emerg Infect Dis* 2002;8(4):440-3.
24. Holt J. Multistate outbreak of Salmonella Typhimurium infections associated with drinking unpasteurized milk-Illinois, Indiana, Ohio, and Tennessee, 2002-2003. *MMWR* 2003;52(26):613-5.
25. D'Argenio P, Romano A, Autorino F. An outbreak of Salmonella Enteritidis infection associated with iced cake. *Eurosurv* 1999;4(2):24-6.
26. Santos RL, Zhang S, Tsoilis RM. Animal model of Salmonella infections: enteritis versus typhoid fever. *Microb Infect* 2001;3:1335-44.
27. Rabsch W, Tschape H, Baumler AJ. Non-typhoidal salmonellosis: emerging problems. *Microb Infect* 2001;3:237-47.
28. Barnaud G, Arlet G, Verdet C, Gaillot O, Lagrange PH, and A. Philippon. Salmonella enteritidis: AmpC plasmid-mediated inducible-lactamase (DHA-1) with an ampR gene from Morganella morganii. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;42:2352-8.
29. Carattoli A. Plasmid-mediated antimicrobial resistance in Salmonella enterica. *Current Issues in Molecular Biology* 2003;5:113-22.
30. Threlfall EJ. Multiresistant Salmonella Typhimurium DT 104: a truly international multiresistant clone. *J Antimicrob Chemother* 2000;46:7-10.
31. Threlfall EJ. Antimicrobial drug resistance in Salmonella: problems and perspectives in food- and water-borne infection. *FEMS Microbiol Rev* 2002;26:141-8.
32. Allen KJ, Poppe C. Phenotypic and genotypic characterization of food animal isolates of Salmonella with reduced sensitivity to ciprofloxacin. *Microb Drug Resist* 2002;8(4):375-83.
33. Vila J, Ruíz , Marco F, Barcelo A, Goñi P, Giralt E. Association between double mutation in gyrA gene of ciprofloxacin-resistant clinical isolates of Escherichia coli and MICs. *Antimicrob Agents Chemother* 1994;38:2477-9.
34. Threlfall EJ, Fisher IST, Berghold C, Gerner-Smidt P, Tschape H, Cormican M, Luzzi I, Schnieder F, Wannet W, Machado J, Edwards G. Antimicrobial drug resistance in isolates of Salmonella enterica from cases of salmonellosis in humans in Europe in 2000: results of international multi-centre surveillance. *Euro Surveill* 2003 8(2):41-5.
35. Tassios PT, Chadjihrstodoulou C, Lambiri M, Kansouzidou-Kanakoudi A, Sarandopoulou Z, Kourea-Kremastinou J, Tzouveleki LS, Legakis NJ. Molecular typing of multidrug-resistant Salmonella Blockley outbreak isolates from Greece. *Emerging Infectious Diseases* 2000;6:60-4.
36. Nastasi A, Mammina C, Cannova L. Antimicrobial Resistance in Salmonella Enteritidis, Southern Italy, 1990-1998. *Emerg Infect Dis* 2000;6:401-3.
37. Brackelsberg CA, Nolan LK, Brown J. Characterization of Salmonella Dublin and Salmonella Typhimurium (Copenhagen) Isolates from cattle. *Vet Res Com* 1997;21:409-20.

38. Allerberger F, Liesegang A, Grif K et. al. Occurrence of Salmonella enterica serovar Dublin in Austria. *Eurosurv* 2002;7(4):65-70.
39. Wilcock BP, Schwartz K.. Salmonellosis. In: Leman AD, Straw BE (Ed.). *Diseases of Swine*. Ames: 7th ed. Iowa State University Press; 1992. p. 570-583.
40. ReporterR. Reptile-Associated Salmonellosis-Selected States, 1998-2002. *MMWR* 2003;52(49):1206-1209.
41. Synnott MB, Brindley M, Gray J, Dawson JK. An outbreak of Salmonella Agona infection associated with precooked turkey meat. *Commun Dis Public Health* 1998;1(3):176-9.
42. 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.
43. 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.
44. Craven PC, Mackel DC, Baine WB, Barker WH, Gangarosa EJ. International outbreak of Salmonella Eastbourne infection traced to contaminated chocolate. *Lancet* 1975;1(7910):788-92.
45. 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.
46. Gizzarelli S, Salmaso S, Toti L, Zanoni D. Microbiologic investigation of chocolate contaminated with Salmonella Napoli. *Nuovi Ann Ig Microbiol* 1983;34(5):347-52.
47. 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.
48. Melloul AA, Hassani L, Rafouk L. Salmonella contamination of vegetables irrigated with untreated wastewater. *World J Microbiol & Biotech* 2001;17:207-9.
49. International Organization for Standardization. General Guidance on methods for the detection of Salmonella. ISO 6579 Microbiology 3rd Edition. 1993-0901.
50. Centre for Reference and Research on Salmonella. *Antigenic formulae of Salmonella*. Paris: WHO Intern. Salmonella Centre, Institute Pasteur; 1980.
51. Popoff, MY *et al.* Supplement 1996 (n. 40) to the Kauffmann-White scheme. *Res Microbiol* 1997;148:811-4.
52. Anderson ES, Ward LR, De Saxe M.J, De Sa J.D.H. Bacteriophage typing designations of S. Typhimurium. *Journal of Hygiene* 1977;78:297-300.
53. Centro di Referenza Nazionale per le Salmonellosi. Programma Enter-Vet, Sorveglianza delle salmonellosi in ambito veterinario, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie. Riepilogo annuale 2002.
54. Centro di Referenza Nazionale per le Salmonellosi. Programma Enter-Vet, Sorveglianza delle salmonellosi in ambito veterinario, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie. Riepilogo annuale 2003.
55. Busani L, Graziani C, Battisti A, Franco A, Ricci A, Vio D, Digiannatale E, Paterlini F, D'Incau M, Owczarek S, Caprioli A, Luzzi I. Antibiotic resistance in Salmonella enterica serotypes Typhimurium, Enteritidis and Infantis from human infections, foodstuffs and farm animals in Italy. *Epidemiol Infect* 2004;132(2):245-51.

APPENDICE A

Terreni utilizzati per l'isolamento e l'identificazione di *Salmonella*

I terreni utilizzati per l'identificazione di *Salmonella* sono Selenite Broth, Muller Kauffmann Tetrathionate Broth Base, Hektoen Enteric Agar, Salmonella-Shigella Agar, Agar Desossicolato Citrato, Bismuto Solfito Agar, Brilliant Green Agar Modified, Kligler's Iron Agar, Buffered Peptone Water, Rappaport Vassiliadis Soy Broth (Rvs), Desoxycholate Agar (Xld) e Chromogenic Salmonella Agar. Di seguito si riportano in dettaglio le composizioni e le preparazioni di ogni singolo terreno.

Selenite Broth (g/l)

Composizione

Tryptone 5 g
Lattosio 4 g
Sodio fosfato bibasico 10 g
Sodio selenito acido 4 g

Preparazione

Sospendere 23 g di polvere in 1000 mL di acqua distillata. Scaldare fino a completa soluzione e distribuire in provette sterili; non eccedere nel riscaldamento e non autoclavare. Il terreno appare limpido e incolore. pH finale 7,0 +/- 0,1.

Descrizione

Selenite Broth è un terreno d'arricchimento per microrganismi appartenenti al genere *Salmonella*. Il terreno è preparato in accordo con la formula descritta da Leifson e raccomandata dall'APHA. Il sodio selenito possiede una elevata tossicità, a pH neutro, per *Escherichia coli* ma non per la maggior parte dei microrganismi appartenenti al gruppo delle salmonelle. Nel terreno è presente un sistema tampone che tende a rendere minimi gli effetti alcalinizzanti indotti dalla riduzione del selenito, che diminuirebbero notevolmente le proprietà selettive del mezzo; gli acidi che sono prodotti dai coliformi a partire dal lattosio contribuiscono anch'essi a neutralizzare le reazioni alcaline del terreno.

Muller Kauffmann Tetrathionate Broth Base (g/l)

Composizione

Tryptone 7 g
Peptone di soia 2,3 g
Sodio cloruro 2,3 g
Calcio carbonat 25 g
Sodio tiosolfato 40,7 g
Sali biliari 4,75 g

Preparazione

Sospendere 82 g di polvere in 1000 mL di acqua distillata. Portare ad ebollizione sotto agitazione e raffreddare a 45 °C. Aggiungere 19 mL di soluzione di iodio e 9,5 mL di una soluzione allo 0,1% di verde brillante. Mescolare bene e distribuire in provette o beute.

Soluzione di iodio: iodio 20 g, potassio ioduro 25 g, acqua distillata q.b. a 100 mL.

Sciogliere lo ioduro di potassio in 5 mL di acqua distillata, aggiungere lo iodio e riscaldare leggermente fino a completa solubilizzazione. Portare al volume finale.

Soluzione di verde brillante: verde brillante 0,1 g, acqua distillata 100 mL .

Riscaldare a 100 °C per 30 minuti per assicurare la completa solubilizzazione del colorante. Conservare in flaconi di vetro lontano dalla luce.

Descrizione

Muller Kauffmann Tetrathionate Broth è preparato secondo una modifica di Kauffmann alla formulazione originale di Muller. Il terreno è raccomandato dall'Ordinanza Ministeriale 11/10/1978 per l'arricchimento di *Salmonella* in campioni alimentari quali latte, gelati e prodotti a base d'uova pastorizzati e da ISO 6785 per latte e derivati. Il terreno è indicato dal rapporto ISTISAN 96/35 per l'arricchimento selettivo di *Salmonella* nel latte e derivati e nelle uova fresche. Per la preparazione del terreno completo si deve aggiungere alla base, raffreddata ad una temperatura inferiore a 45 °C, verde brillante e soluzione iodica. L'aggiunta eventuale di novobiocina 4 mg/L sopprime la crescita dei proteus. Muller Kauffmann Tetrathionate Broth non è indicato se si sospetta la presenza di *S. Typhi*.

Hektoen Enteric Agar (g/l)

Composizione

Triptosio 12 g
Estratto di lievito 3 g
Sali biliari n. 3; 9 g
Lattosio 12 g
Saccarosio 12 g
Salicina 2 g
Sodio cloruro 5 g
Sodio tiosolfato 5 g
Fe-Ammonio citrato 1,5 g
Agar 15 g
Blu di bromotimolo 0,065 g
Fucsina acida 0,1 g

Preparazione

Sospendere 76,6 g di polvere in 1000 mL di acqua distillata. Portare ad ebollizione sotto agitazione, lasciar bollire 1-2 minuti e trasferire in piastre sterili. Non autoclavare. pH finale 7,4 +/- 0,2.

Descrizione

Hektoen Enteric Agar è un terreno selettivo, preparato secondo la formula di King e Metzger, per l'isolamento e la differenziazione dei Gram-negativi della flora intestinale. Il terreno permette di distinguere facilmente la flora che fermenta lattosio, saccarosio e salicina, da quella che non fermenta tali zuccheri; King e Metzger affermano che *Salmonella Arizonae* si comporta come non fermentante. Con l'impiego dell'Hektoen Enteric Agar è possibile anche una primaria differenziazione, tra *Salmonella* e *Shigella*.

Salmonella-Shigella Agar (G/L)

Composizione

Estratto di carne 5 g
Peptocomplex 5 g
Lattosio 10 g
Sali biliari n. 3 8,5 g
Sodio tiosolfato 8,5 g
Sodio citrato 8,5 g
Ferro citrato 1 g
Rosso neutro 0,025 g
Agar 13,5 g
Verde brillante 0,330 mg

Preparazione

Sospendere 60 g di polvere in 1000 mL di acqua distillata. Portare ad ebollizione sotto agitazione, distribuire in piastre sterili. Si raccomanda di non eccedere nel riscaldamento del terreno. Non autoclavare. pH finale 7,0 +/- 0,2.

Descrizione

SS Agar è un terreno selettivo e differenziale, indicato per l'isolamento di *Salmonella* dalle feci e da campioni di altra origine. Il terreno è preparato in accordo con la formula raccomandata dall'APHA. SS Agar offre un'ottima distinzione degli enterobatteri lattosio non fermentanti da quelli lattosio fermentanti la cui crescita è consentita dagli inibitori presenti. Il terreno fu originariamente descritto come mezzo selettivo adatto all'isolamento di *Salmonella* e *Shigella*. Il sodio citrato, i sali biliari e il verde brillante dell'SS Agar inibiscono la crescita dei microrganismi Gram-positivi e di alcuni enterobatteri non patogeni. Il lattosio è inserito nel terreno come carboidrato fermentabile per differenziare i microrganismi lattosio fermentanti da quelli non fermentanti. Il rosso neutro è presente come indicatore di pH. Quando il mezzo diventa acido per la fermentazione del lattosio, vi è una precipitazione dei sali biliari e le colonie assumono il colore dell'indicatore. *Salmonella* e altri microrganismi lattosio non fermentanti appaiono come piccole colonie, opache, trasparenti o traslucide, prive di colore. Alcune specie dei generi *Proteus* e *Salmonella* presentano colonie con centro nero; ciò è dovuto alla precipitazione del ferro solfuro, indotta dalla produzione di idrogeno solforato a partire dal sodio tiosolfato presente nel terreno.

Agar Desossicolato Citrato

Composizione

Estratto di carne 5 g
Proteose peptone 5 g
Lattosio 10 g
Tiosolfato di sodio 5,4 g
Citrato ferrico 1 g
Citrato di sodio 8,5 g
Desossicolato di sodio 5 g
Rosso neutro 0,02
Agar 12 g

Preparazione

Sospendere 52 g di polvere in 1000 mL di acqua distillata. Portare ad ebollizione sotto agitazione, distribuire in piastre sterili. Non autoclavare. pH finale 7,0 +/- 0,2.

Bismuto Solfito Agar (G/L)

Composizione

Estratto di carne 5 g
Peptone 10 g
Glucosio 5 g
Sodio fosfato monoacido 4 g
Solfato ferroso 0,3 g
Bismuto solfito 8 g
Verde brillante 0,016 g
Agar 12-18 g

Preparazione

Sospendere 47,5 g di polvere in 1000 mL di acqua distillata fredda. Agitare fino a rendere uniforme la sospensione e trasferire in piastre sterili. Non autoclavare. pH finale 7,6 +/- 0,2.

Descrizione

Il verde brillante e il bismuto inibiscono la flora batterica. La presenza di salmonelle viene evidenziata da una colorazione scura a causa della formazione di ioni solfuro e dalla riduzione del bismuto che produce lucentezza intorno alle colonie.

Brilliant Green Agar Modified (G/L)

Composizione

Estratto di carne 5 g
Peptone 10 g
Estratto di lievito 3 g
Sodio fosfato bibasico 1 g
Sodio fosfato monobasico 0,6 g
Lattosio 10 g
Saccarosio 10 g
Verde brillante 0,0047 g
Rosso fenolo 0,09 g
Agar 13 g

Preparazione

Sospendere 53,7 g in 1000 mL di acqua distillata. Scaldare fino ad ebollizione sotto agitazione. Non autoclavare. pH finale 6,9 +/- 0,1

Descrizione

Brilliant Green Agar Modified è preparato in accordo alla formulazione indicata dai metodi ISO per la determinazione di *Salmonella* negli alimenti. I vantaggi di questo terreno rispetto alla formulazione classica sono: una maggior inibizione di *E. coli*, *Proteus* e *Pseudomonas*. La normativa generale per gli alimenti descritta da ISO 6579 prevede un pre-arricchimento non selettivo del campione in *Buffered Peptone Water*, e un arricchimento selettivo in *Rappaport Vassiliadis Broth* e in *Selenite Cystine Broth*, il primo incubato a 42 °C per 24 ore, il secondo a 35-37 °C per 24 + 24 ore. Le crescite nei due brodi selettivi sono trapiantate, per ciascun brodo, su due terreni in piastra: il primo è indicato dalla norma ISO nel *Brilliant Green Agar Modified* o nell'XLD, il secondo è lasciato a discrezione del laboratorio.

Kliger's Iron Agar (G/L)

Composizione

Estratto di carne 3 g
Estratto di lievito 3 g
Peptone idrolizzato di caseina 20 g
Cloruro di sodio 5 g
Lattosio 10 g
Glucosio 1 g
Solfato ferroso 0,2 g
Sodio tiosolfato 0,3 g
Rosso fenolo 0,025 g
Agar 12 g

Preparazione

Sospendere 55 g in 1000 mL di acqua distillata. Autoclavare 15 minuti a 121 °C, dispensare in provette e lasciare solidificare in modo da ottenere un becco di clarino. pH finale 7,4 +/- 0,2.

Descrizione

L'agar ferro di Kliger è utile per l'identificazione dei batteri gram negativi cresciuti sui terreni di primo isolamento. La mancanza di inibitori permette la crescita di tutte le specie batteriche, ad eccezione delle più esigenti. L'agar disposto a becco di clarino fa sì che nella stessa provetta si formino due camere di reazione: la parte a becco è aerobia, mentre il fondo è anaerobio. La composizione del terreno ci permette di capire se il batterio è un fermentante, se produce idrogeno solforato ed eventualmente la produzione di gas da glucosio. Nel caso di salmonelle avremo becco di clarino alcalino per assenza di fermentazione del lattosio, fondo acido per fermentazione del glucosio e produzione di idrogeno solforato.

Buffered Peptone Water (G/L)

Composizione

Peptone 10 g
Sodio cloruro 5 g
Sodio fosfato bibasico 3,5 g
Potassio fosfato monobasico 1,5 g

Preparazione

Sospendere 20 g in 1000 mL di acqua distillata; riscaldare fino a completa soluzione, distribuire e autoclavare a 121 °C per 20 minuti. pH finale 7,0 +/- 0,1.

Descrizione

Buffered Peptone Water è un terreno non selettivo preparato secondo la formulazione di ISO 6579; è indicato per la fase di pre-arricchimento nelle procedure di isolamento delle salmonelle nei prodotti alimentari e nelle acque. Buffered Peptone Water è raccomandato da ISO 6579 nella norma di carattere generale per l'isolamento di *Salmonella* e da numerose norme specifiche di prodotto. Il terreno è indicato anche dall'O.M. 11.10.78 per il pre-arricchimento non selettivo di preparati pastorizzati a base d'uovo.

Rappaport Vassiliadis Soy Broth (Rvs) (G/L)

Composizione

Peptone di soia 4,5 g
Sodio cloruro 7,2 g
Potassio fosfato monobasico 1,26 g
Potassio fosfato bibasico 0,18 g
Magnesio cloruro 13,58 g
Verde malachite 0,036 g

Preparazione

Sospendere 26,75 g in 1000 mL di acqua distillata. Scaldare leggermente per sciogliere il terreno, distribuire 10 mL in provette con tappo a vite e autoclavare a 115 °C per 15 minuti. pH 5,2 +/- 0,2

Descrizione

RVS Broth è un terreno impiegato per l'arricchimento selettivo di *Salmonella* in campioni alimentari, ambientali e nelle acque. Rispetto alla formulazione classica l'RVS Broth contiene il potassio fosfato bibasico e concentrazioni inferiori di magnesio cloruro e potassio fosfato monobasico. Queste modificate concentrazioni saline consentono un migliore mantenimento del pH e un miglioramento nell'isolamento delle salmonelle. RVS Broth è prodotto in accordo alla formulazione rivista da Van Schothorst e coll.

Desoxycholate Agar (Xld) (G/L)

Composizione

Xilosio 3,5 g
L-lisina 5 g
Lattosio 7,5 g
Saccarosio 7,5 g
Sodio cloruro 5 g
Estratto di lievito 3 g

Sodio desossicolato 2,5 g
 Sodio tiosolfato 6,8 g
 Fe-Ammonio citrato 0,8 g
 Rosso fenolo 0,08 g
 Agar 15 g

Preparazione

Sospendere 56,5 g di polvere in 1000 mL di acqua distillata. Portare ad ebollizione sotto agitazione, raffreddare a 50 °C e trasferire in piastre sterili. Non eccedere nel riscaldamento del terreno e non autoclavare. pH finale 7,4 +/- 0,2.

Descrizione

(XLD) Agar è un terreno selettivo e differenziale usato per l'isolamento degli enterobatteri patogeni e in particolare è il terreno d'elezione per l'isolamento di *Shigella*. Il terreno è preparato in accordo con la formula originale descritta da Taylor e secondo le indicazioni di USP XXI ed EP 3rd Ed. XLD Agar permette una differenziazione degli enterobatteri sulla base della fermentazione dello xilosio, della decarbossilazione della lisina e della produzione di idrogeno solforato a partire dal sodio tiosolfato. Il sodio desossicolato inibisce la crescita dei microrganismi Gram-positivi, il rosso fenolo è presente come indicatore di pH, il ferro ammonio citrato come indicatore della produzione di idrogeno solforato. *Salmonella* fermenta lo xilosio con acidificazione del mezzo e decarbossila la lisina con conseguente inversione del pH del terreno a valori alcalini; ad eccezione di alcune specie H₂S negative (*Salmonella Paratyphi A*, *Salmonella Choleraesuis*, ecc.), *Salmonella* possiede anche l'attività tiosolfato reduttasica, quindi su XLD si ottengono colonie rosse con centro nero per la precipitazione del ferro solfuro. Il lattosio e il saccarosio sono presenti nel terreno per produrre un eccesso di acido e differenziare quindi *Salmonella* dai coliformi lisina-decarbossilasi positivi.

Chromogenic Salmonella Agar (G/L)

Composizione

Peptone 10 g
 Miscela di inibitori 12 g
 Miscela di cromogeni 0,9 g
 Agar 15 g
Salmonella Selective Supplement, Vial A (per fiala)
Salmonella Selective Supplement, Vial B (per fiala)

Preparazione

Sospendere 19 g di terreno in 500 mL di acqua distillata; aggiungere il contenuto di un flacone di *Salmonella* Selective Supplement, Vial A. Portare ad ebollizione sotto agitazione e autoclavare a 121 °C per 15 minuti.

Raffreddare a circa 50 °C e aggiungere il contenuto di una fiala di *Salmonella* Selective Supplement, Vial B, ricostituito con 2 mL di acqua distillata sterile. Mescolare con cura e distribuire in piastre di Petri. pH 7,2 +/- 0,2.

Descrizione

Chromogenic Salmonella Agar è un terreno selettivo e diagnostico, adatto per l'isolamento e l'identificazione di *Salmonella* spp., inclusa *S. Typhi*, da campioni clinici e alimentari. La selettività del terreno è garantita da una miscela di sostanze inibenti comprendente una cefalosporina, attiva soprattutto nella soppressione della crescita di *Pseudomonas* spp., sali biliari, attivi nella soppressione dei batteri Gram-positivi e di alcuni Gram-negativi, Tergitol 4, inibitore soprattutto di *Proteus* spp. La differenziazione tra i ceppi di *Salmonella* e di *non-Salmonella* è ottenuta attraverso:

1. la presenza nel terreno di un substrato cromogenico sul quale agisce una esterasi specifica di *Salmonella* con liberazione di un metabolita color rosso magenta;
2. la presenza di un derivato cromogenico glucopiranosidico sul quale agisce la β -glucosidasi con liberazione di un metabolita color verde-blu.

Chromogenic Salmonella Agar può essere usato in accordo alle normali procedure di laboratorio con semina diretta del campione o dopo arricchimento nei terreni liquidi tradizionali. Dopo incubazione delle piastre seminate per 18-24 ore la presenza di colonie rosso-magenta indicheranno la presenza di *Salmonella*. Le colonie caratteristiche dovranno essere sottoposte ai test biochimici e sierologici di conferma.

APPENDICE B

Test per l'identificazione di *Salmonella*

TEST AGGLUTINAZIONE AL LATTICE (ANI SALMONELLA TEST, ANI BIOTECH OY)

Utilizza molecole di anticorpi, adsorbite sulla superficie di particelle al lattice, specifici verso antigeni flagellari e somatici di *Salmonella*. Quando sono in sospensione, le particelle con gli anticorpi adesi formano un liquido di consistenza uniforme lattiginosa; l'introduzione dell'antigene determina un legame antigene-anticorpo. Questa aggregazione secondaria determina la formazione di una struttura che, precipitando, dà luogo a una reazione di agglutinazione. Gli antisieri flagellari inclusi in ANI *Salmonella* Test sono: a, b, c, d, ch, fg, gp, gms, gq, gst, I, k, gpu, lv, mt, r, y, z, lw, enz15, enx, 1,2, 1.5, 1.6, 1.7, z4, z6, z10, z23, z,24, z,29, z31. La versatilità degli anticorpi impiegati e la loro qualità garantiscono elevati livelli di sensibilità e specificità del test e coprono praticamente tutti i sierotipi di *Salmonella*. Il reattivo al lattice è essiccato sulla card in "aree test". Quando la colonia di *Salmonella* è emulsionata nell'area test vi è una forte agglutinazione del lattice che si rende visibile ad occhio nudo.

Procedura:

1. aggiungere in un'area test una goccia di PBS;
2. prelevare una colonia tipica dal terreno d'isolamento e miscelarla con la soluzione salina tamponata depositata nell'area test, in modo che si formi una sospensione omogenea che copra tutta l'area;
3. ruotare delicatamente la card e osservare per la formazione di agglutinati blu che si formeranno in caso di risultato positivo in 1 minuto.

Limiti:

- le colonie in fase R possono dare agglutinazioni aspecifiche del PBS;
- alcuni ceppi immobili (*S. Pullorum*) possono dare falsi negativi;
- il test è applicabile solo alle Enterobatteriaceae poiché alcuni batteri ossidasi positivi;
- possono dare falsi positivi.

MUCAP Test

MUCAP Test è un reattivo, contenente un estere a otto atomi di carbonio coniugato con il metilumbelliferone in solvente organico, sensibile e specifico per l'identificazione di *Salmonella spp.* su piastra di primo isolamento. Il composto a otto atomi di carbonio coniugato con il metilumbelliferone è esterificato dall'enzima C8 esterasi con liberazione di metilumbelliferone, composto fluorescente se si osservano le piastre sotto lampada di Wood con emissione a 366 nm.

Procedura:

- sottoporre al test le colonie cresciute su terreno di prima semina con i caratteri presuntivi tipici delle salmonelle e che non presentino una fluorescenza naturale;
- operare secondo lo schema seguente:
 1. osservare sotto lampada di Wood (366 nm) le colonie, prima dell'aggiunta del reattivo per assicurarsi che non vi sia una fluorescenza spontanea;
 2. deporre una goccia di reattivo su colonie isolate o su ammassi di colonie;
 3. attendere 3-5 minuti quindi osservare, in penombra, sotto lampada di Wood.

Risultato positivo: comparsa di fluorescenza azzurra su tutta la superficie delle colonie o sul bordo di esse per le colonie con centro nero.

Risultato negativo: nessuno sviluppo di fluorescenza.

Le colonie che hanno dato risposta positiva possono essere presuntivamente considerate come *Salmonella spp.* e sottoposte alle prove biochimiche e sierologiche abituali mentre quelle che hanno dato risposta negativa possono essere considerate non appartenenti al genere *Salmonella*.

Limiti:

- i più frequenti falsi positivi sono dati da *Pseudomonas spp.*, per cui sulle colonie fluorescenti, eseguire il test dell'ossidasi;

non effettuare letture oltre i 5 minuti poiché il reattivo può andare incontro a fenomeni di autolisi dovuti all'ambiente acquoso del terreno di coltura e dare quindi falsi positivi.

*La riproduzione parziale o totale dei Rapporti e Congressi ISTISAN
deve essere preventivamente autorizzata.
Le richieste possono essere inviate a: pubblicazioni@iss.it.*

*Stampato da Tipografia Facciotti srl
Vicolo Pian Due Torri 74, 00146 Roma*

Roma, settembre 2005 (n. 3) 16° suppl.