

# EPIDEMIA CAUSATA DA SALMONELLA CHOLERAESUIS IN CINGHIALI DELLA PROVINCIA DI PORDENONE

## OUTBREAK OF SALMONELLA CHOLERAESUIS IN WILD BOARS IN PORDENONE PROVINCE

VIO D.<sup>1</sup>, USTULIN M.<sup>1</sup>, BARCO L.<sup>2</sup>, ZAMBON P.<sup>1</sup>, RIGO S.<sup>1</sup>, PEROSA G.<sup>1</sup>, TAGLIENTE D.<sup>1</sup>, BRUNETTA C.<sup>1</sup>, PINZIN V.<sup>1</sup>, RE E.<sup>3</sup>, PALEI M.<sup>4</sup>, CONEDERA G.<sup>1</sup>

*1 Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (IZSVe), SCT 4 Friuli VG, Pordenone*

*2 Centro di Riferenza Nazionale per le Salmonellosi, IZSVe SCS 8, Legnaro (PD).*

*3 Unità Sanitaria Locale ASS 6, Servizio Veterinario, Pordenone*

*4 Regione Autonoma Friuli Venezia Giulia, Servizio Sicurezza Alimentare, Igiene della Nutrizione e Sanità Pubblica Veterinaria*

**Parole chiave:** *Salmonella Choleraesuis*, cinghiale

**Keywords:** *Salmonella Choleraesuis*, wild boar

**Riassunto:** A partire dalla fine di febbraio 2012 in provincia di Pordenone è stata riscontrata una mortalità anomala nella popolazione di cinghiali selvatici. Le indagini anatomopatologiche e batteriologiche effettuate sulle carcasse rinvenute hanno identificato come causa della morte dei soggetti l'infezione setticemica da *Salmonella spp.* di gruppo C caratterizzata biochimicamente come *Salmonella Choleraesuis* e antigenicamente come *Salmonella enterica* C1 6,7:-:1,5. Analisi volte a evidenziare la presenza del patogeno sono state eseguite non solo su soggetti rinvenuti morti ma anche su organi di animali cacciati. Il presente lavoro descrive i risultati finora ottenuti dalle analisi eseguite sulle carcasse e sui campioni di organi conferiti.

**Abstract:** At the end of February 2012 a high mortality in wild boars population was reported in Pordenone province. Pathological and bacteriological analysis performed on wild boars identified septicaemia caused by *Salmonella* group C as cause of death. Isolated strains were biochemically identified as *Salmonella Choleraesuis* and antigenically typed as *Salmonella enterica* C1 6,7:-:1,5. Further analysis were performed not only on carcasses but also on organs of hunted animals. In this study we describe the results obtained from the analysis carried out until 31 December 2012 on submitted samples to our Institute.

### INTRODUZIONE

A partire dalla fine di febbraio 2012 sono stati riportati casi di mortalità anomala nella popolazione di cinghiali selvatici in provincia di Pordenone. Alcune delle carcasse dei soggetti rinvenuti morti sono state conferite alla Sezione di Pordenone dell'Istituto Zooprofilattico delle Venezie per l'esame necroscopico e le analisi del caso. A seguito dell'isolamento di *Salmonella spp.* di gruppo C caratterizzata biochimicamente come *Salmonella Choleraesuis* e antigenicamente come *Salmonella enterica* C1 6,7:-:1,5 e considerato il pericolo per la Sanità Pubblica potenzialmente rappresentato da questo tipo di patogeno, l'Autorità Sanitaria Regionale, supportata dal Servizio Sanitario Locale, dal Servizio Caccia e Pesca della Provincia e dall'IZSVe, ha informato i cacciatori riguardo

i rischi connessi alla manipolazione delle spoglie dei cinghiali e al consumo di carni di cinghiale non cotte, chiedendo di conferire le carcasse rinvenute alla Sezione IZSve di Pordenone. È stato inoltre richiesto il conferimento presso l'Istituto di polmoni, fegato e milza degli animali cacciati per l'esecuzione dell'esame anatomico-patologico e batteriologico per la ricerca di *Salmonella spp.*, al fine di monitorare la diffusione del patogeno nella popolazione selvatica.

## **MATERIALI E METODI**

### *Campionamento*

Dal 15/03/2012 al 31/12/2012 sono state sottoposte ad analisi 24 carcasse di cinghiali rinvenuti morti e gli organi di 259 soggetti cacciati, per un totale di 673 campioni di organi (254 fegati, 249 polmoni, 170 milze).

Inizialmente sono state incluse nel monitoraggio tutte le Riserve di caccia dei Distretti Venatori della Pedemontana Pordenonese e dell'Alta Pianura Pordenonese. Le analisi eseguite sugli organi dei primi 190 soggetti abbattuti in azione venatoria hanno evidenziato che la distribuzione delle positività per *Salmonella Choleraesuis* era limitata a sole cinque Riserve confinanti della zona Pedemontana ed è stato pertanto deciso di limitare il monitoraggio all'area interessata dall'infezione e alle Riserve di caccia limitrofe.

### *Esame autoptico*

Tutte le carcasse e gli organi conferiti sono stati sottoposti ad esame autoptico; gli organi dei soggetti in buono stato di conservazione, in caso di evidenza di alterazioni anatomico-patologiche, sono stati sottoposti ad esame istologico.

### *Esami batteriologici e ricerca Salmonella*

Tutti i campioni di organo (fegato, milza e polmone) provenienti sia da carcasse di animali morti che appartenenti ad animali regolarmente abbattuti sono stati sottoposti singolarmente ad esame batteriologico; i terreni utilizzati sono stati Agar Sangue (AS) ed Eosin Methilene Blue Agar (EMB) incubati a 37 °C per 24-48 ore.

Pool di organi costituiti da polmone, milza e fegato di tutti i soggetti conferiti (sia morti che cacciati) sono stati sottoposti alla ricerca specifica di *Salmonella spp.* in base ad una procedura interna, adattamento della metodica descritta nella ISO 6579:2002/Amd1:2007 e integrata secondo quanto previsto dal manuale OIE nei capitoli 2.9.9 (Salmonelle mobili) e 2.3.11 (*Salmonella Pullorum* e *Salmonella Gallinarum*). Tale procedura è applicabile sia alla ricerca di Salmonelle mobili che immobili e specie specifiche nei campioni di origine animale diversi da feci e campioni ambientali. Per il prearricchimento è stato prelevato un pool di 25g degli organi sopradescritti e omogeneizzato in 225 ml di Acqua peptonata tamponata sterile (APTS). Nel caso di carcasse di animali morti, la ricerca di Salmonella è stata eseguita anche da intestino prelevando 1 g di contenuto intestinale e omogeneizzandolo in 9 ml di APTS. Ogni campione in APTS è stato incubato a 37°C ± 1°C per 18 h ± 2 h. Al termine dell'incubazione si è proceduto all'arricchimento inoculando 0,1 ml del prearricchito in 9 ml di Brodo Rappaport Vassiliadis addizionato con soia (RVSB). Il brodo è stato incubato a 37°C ± 1°C per 24 h ± 3 h. Al termine dell'incubazione un'ansata di brodo di arricchimento è stata seminata su piastre di Brillant Green Agar (BGA), Xylose Lysine

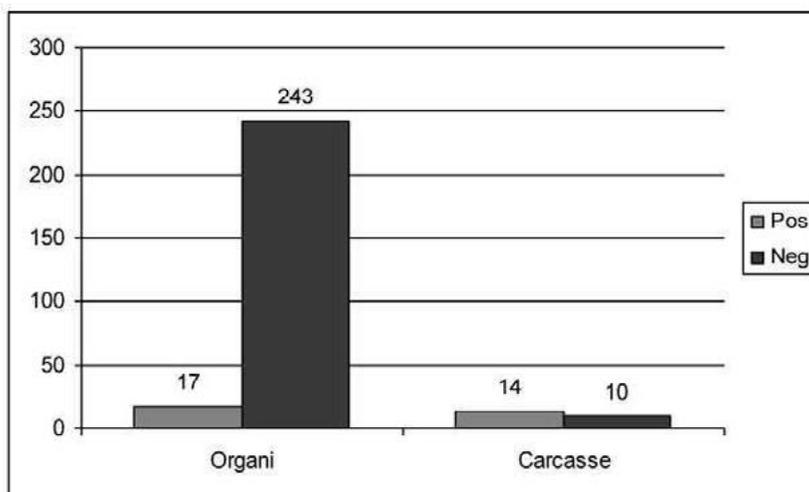
Deoxycholate Agar (XLD) e McConkey Agar (McC), incubate a  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , con lettura della piastra a 24, 48 e 72 h. Su BGA le colonie di Salmonella presentano colorito rosso/rosa con viraggio del terreno al rosa, su XLD le colonie di Salmonella produttrici di  $\text{H}_2\text{S}$  presentano precipitato nero e alone rosa, mentre i ceppi non produttori di  $\text{H}_2\text{S}$  determinano la formazione di colonie rosate. Generalmente le Salmonelle immobili e specie specifiche, come *Salmonella Choleraesuis*, non producono  $\text{H}_2\text{S}$  o ne sono solo deboli produttrici, come nel caso dei ceppi isolati in questo studio. Il terreno McC permette di evidenziare la fermentazione del lattosio, le colonie di Salmonella e delle altre Enterobatteriacee lattosio negative sono incolori.

Le colonie con morfologia riconducibile a *Salmonella spp.* sono state seminate su Kligler Iron Agar (KIA) e incubate a  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  per  $24 \text{ h} \pm 3 \text{ h}$ . La crescita di colture tipiche di Salmonella su KIA determina il viraggio al giallo della parte inferiore del terreno, ma la precipitazione di  $\text{H}_2\text{S}$  ne determina l'annerimento, mentre la porzione a becco di clarino rimane rossa con precipitato nero in corrispondenza della patina batterica (aspetto a coda di topo). I ceppi isolati nel corso del presente studio, deboli produttori di  $\text{H}_2\text{S}$ , hanno determinato l'annerimento parziale della parte inferiore del terreno.

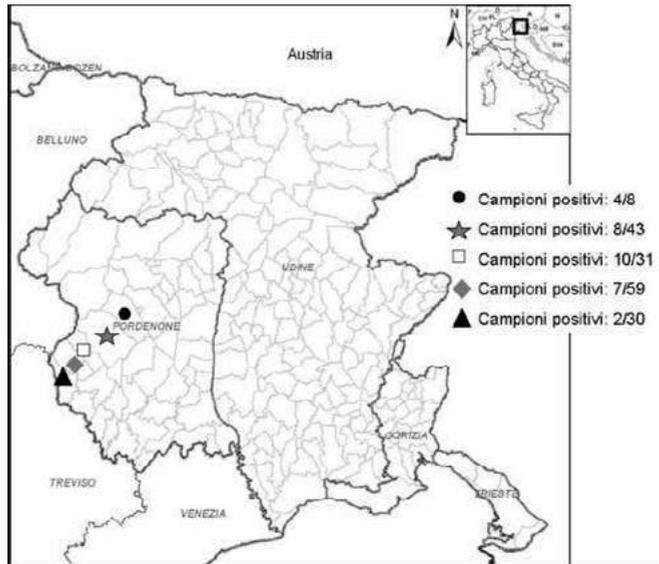
Dai ceppi che presentavano su KIA caratteristiche tipiche di *Salmonella spp.* si è proceduto alla conferma biochimica utilizzando il kit d'identificazione API20E (Biomerieux) e, una volta ottenuta tale conferma, a seminare il ceppo su di Agar Triptosio (AT) per la sierotipizzazione secondo lo schema Kauffman-White eseguita dal Centro di Referenza Nazionale per le Salmonellosi; i ceppi tipizzati sono stati conservati.

## RISULTATI

Al 31/12/2012 *Salmonella Choleraesuis*. è stata isolata da 14 delle 24 carcasse conferite di cinghiali rinvenuti morti (58,3%) e da 17 dei 259 animali cacciati (6,5%) per un totale di 31 animali (Graf. 1). Le positività si sono localizzate in 5 comuni attigui della provincia di Pordenone (Fig. 1): Aviano, Budoia, Caneva, Montereale Valcellina e Polcenigo.

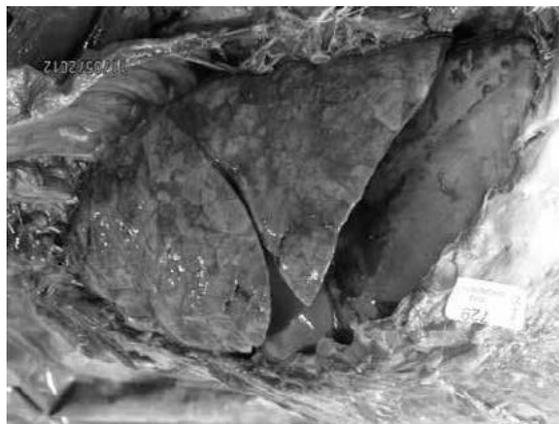


**Graf. 1:** Distribuzione delle positività su carcasse e organi di animali abbattuti



**Fig. 1:** Distribuzione geografica dei campioni positivi per *Salmonella spp.*

L'esame necroscopico delle carcasse (n. 24) ha evidenziato prevalentemente le seguenti lesioni: congestione ed edema interstiziale a carico dei polmoni (figura 2), pleurite acuta (in un caso le lesioni presentavano le caratteristiche di una polmonite necrotico-emorragica associata a pleurite); epato-splenomegalia, linfoadenopatia; in due soggetti sono inoltre state evidenziate petecchie emorragiche a carico della corticale renale, due soggetti presentavano gastrite emorragica. In un soggetto, oltre alle lesioni sopradescritte è stata rilevata endometrite purulenta (figura 3), linfoadenomegalia del distretto inguinale e grave degenerazione epatica; in questo caso le indagini istologiche hanno evidenziato endometrite purulento-necrotico-ulcerativa, lesioni pio-granulomato-se-necrotiche a carico dei linfonodi inguinali, istiocitosi splenica, epatite pio-granulomatosa necrotica multifocale e steatosi multifocale e degenerazione idropica degli epatociti.



**Fig 2:** Polmonite necrotico-emorragica in un soggetto rinvenuto morto.



**Fig. 3:** Endometrite purulenta in un soggetto rinvenuto morto.

Gli esami istologici eseguiti nei soggetti in buono stato di conservazione hanno evidenziato quadri omogenei caratterizzati da polmonite necrotico-emorragica del parenchima polmonare, necrosi epatica, emorragie spleniche associate ad aggregati batterici. In un solo caso è stata rilevata enterite necrotica associata ad aggregati batterici e infiltrazione di granulociti eosinofili e di linfoplasmacellule nella lamina propria. A carico degli organi degli animali cacciati non sono state rilevate lesioni anatomopatologiche riferibili all'infezione da *Salmonella*.

Nelle 14 carcasse positive all'esame batteriologico, *Salmonella Choleraesuis* è stata isolata in purezza e in carica elevata dagli organi e solo in due casi dall'intestino. Per quanto riguarda l'isolamento di altri patogeni batterici soltanto nel polmone di un cinghiale cacciato è stata riscontrata la presenza di *Pasteurella multocida* mentre dall'utero di una femmina a carico della quale è stata rilevata una grave endometrite purulenta è stato rilevato *Escherichia coli* in carica elevata.

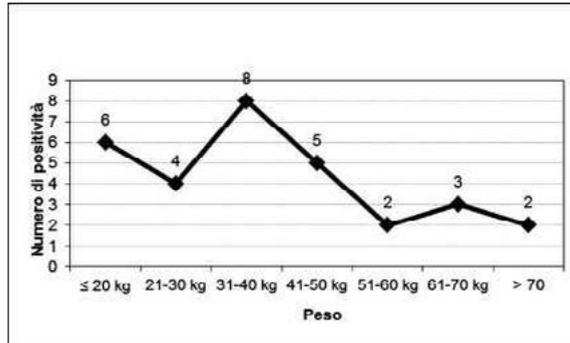
In 8 dei soggetti cacciati è stato possibile evidenziare *Salmonella Choleraesuis* solamente mediante la ricerca specifica del patogeno, mentre in 7 dei soggetti cacciati *Salmonella Choleraesuis* è stata invece isolata solamente all'esame batteriologico di uno o più organi.

Tutti i ceppi isolati sono stati caratterizzati biochimicamente come *Salmonella Choleraesuis*, di questi 24 sono stati identificati sierologicamente come Gr. C1 6,7:-:1,5 *S. enterica* subsp *enterica*, 2 come Gr. C1 6,7:c:1,5 *S. Choleraesuis* var Kunzendorf, 4 come :-:-:1,5 *S. enterica* subsp *enterica*, 1 come :-:c:1,5 *S. enterica* subsp *enterica*.

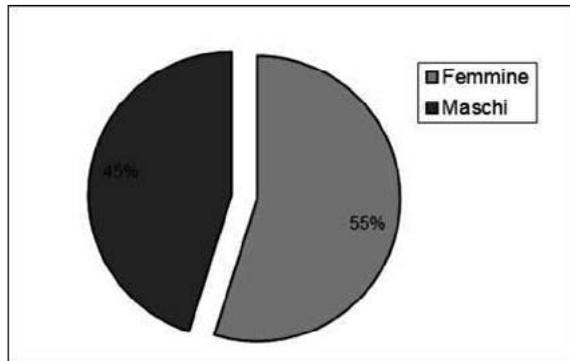
Quattro ceppi sono stati inviati al Laboratorio di Referenza Europeo per la *Salmonella* (RIVM, Bilthoven-NL), il quale confermando le tipizzazioni effettuate ha ulteriormente classificato 3 ceppi come biovar Decatur e uno come biovar Kunzendorf.

Un ceppo di *Salmonella spp.* proveniente dagli organi di un cinghiale cacciato, è stato caratterizzato antigenicamente come *Salmonella Typhimurium*.

Gli animali positivi erano soggetti giovani, di peso vivo compreso tra 10 e 85 chilogrammi (Graf. 2).

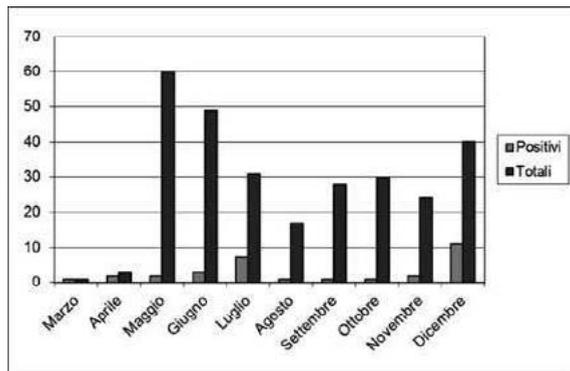


**Graf. 2:** Distribuzione dei pesi nei soggetti positivi  
Per quanto concerne il sesso degli animali conferiti, 17 erano femmine e 14 maschi (Graf. 3).



**Graf. 3:** Distribuzione delle positività in base al sesso

Come si evince dal Graf. 4, il maggior numero di soggetti rinvenuti positivi sono stati conferiti nei mesi di luglio e dicembre.



**Graf. 4:** Distribuzione temporale delle positività

## DISCUSSIONE

*Salmonella* Choleraesuis è causa nel suino di forme setticemiche caratterizzate da bassa morbilità, generalmente inferiore al 10%, ed elevata letalità. Le forme cliniche sono caratterizzate da febbre elevata, sintomi respiratori, letargia, cianosi delle estremità e dell'addome, talvolta ittero. Le lesioni anatomopatologiche comprendono splenomegalia, epatomegalia, linfadenopatia, polmonite interstiziale, necrosi epatica focale che comunque non sono evidenziabili regolarmente in tutti i soggetti colpiti (Zimmerman et al., 2006).

L'infezione causata da *Salmonella* Choleraesuis, specie specifica del suino, ha una prevalenza elevata in Paesi asiatici e nel Nord America mentre è rara in Australia ed Europa (Fedorka-Cray et al., 2000).

Le varianti sierologiche di *Salmonella* Choleraesuis isolate nel corso del presente studio sembrano essere particolarmente rare e non ci risulta che siano mai state isolate prima nel Nord Est Italia. In particolare *Salmonella* Choleraesuis non è mai stata isolata durante i programmi di sorveglianza sanitaria della fauna selvatica che si svolgono regolarmente da diversi anni nella regione Friuli Venezia Giulia.

In nessuno degli allevamenti di suini della regione è stata identificata la presenza di *Salmonella* Choleraesuis né in corso di focolai di salmonellosi né durante in un recente studio di prevalenza effettuato presso il nostro Istituto.

Pur trattandosi di una variante di *Salmonella* specie specifica dei suidi, *Salmonella* Choleraesuis può, in rari casi, causare gravi infezioni setticemiche anche nell'uomo; pertanto sono stati previsti interventi per prevenire la possibilità che categorie a rischio (cacciatori, guardie forestali) possano contrarre tale infezione venendo a contatto con animali portatori sani o carcasse di animali deceduti.

Mentre l'elevato livello di biosicurezza degli allevamenti intensivi rende molto improbabile il contatto con selvatici e dunque la trasmissione del patogeno, il rischio può invece essere concreto nei suini allevati all'aperto.

L'aumento dei prelievi venatori, delle denunce di danni alle coltivazioni e degli investimenti hanno dimostrato come negli ultimi anni la popolazione di cinghiali nella regione Friuli Venezia Giulia sia notevolmente aumentata e come questi animali dimostrino scarso timore ad avvicinarsi ad aree abitate. Le abitudini gregarie di questa specie possono spingere gli animali ad avvicinarsi a zone occupate da suini domestici allevati all'aperto. Le recinzioni elettrificate generalmente utilizzate per contenere animali allevati allo stato brado o semibrado si sono dimostrate efficaci anche per impedire l'accesso dei cinghiali alle zone occupate dai suini domestici, tuttavia piccoli allevamenti familiari che non dispongono di questa protezione possono rappresentare un punto di contatto tra domestico e selvatico.

Tenuto conto che la maggior parte dei campioni positivi appartenevano ad animali giovani, di peso inferiore ai 50 chilogrammi, è probabile che questa categoria di età sia quella più frequentemente colpita dall'infezione.

## CONCLUSIONI

I risultati del presente studio evidenziano la possibilità che il cinghiale possa diventare fonte di *Salmonella* Choleraesuis per l'uomo. La Regione Friuli Venezia Giulia, supportata dai Servizi Veterinari, dal Servizio Caccia e Pesca della Provincia di Pordenone e dall'Istituto Zooprofilattico delle Venezie in seguito ai primi casi confermati, ha fornito informazioni rivolte ai cacciatori richiedendo di riferire casi di mortalità anomala nella popolazione di cinghiale, la presenza di animali morti sul territorio e di conferire fegato, milza e polmoni degli animali abbattuti. I cacciatori sono stati inoltre informati in merito ai rischi connessi alla manipolazione ed eviscerazione delle carcasse ed è stato fortemente sconsigliato il consumo

di prodotti a base di carni crudi quali insaccati.

L'infezione causata da *Salmonella* Choleraesuis nel suino, ha una prevalenza elevata in Paesi asiatici e nel Nord America mentre è rara in Australia ed Europa (Fedorka-Cray et al., 2000). Le varianti sierologiche di *Salmonella* Choleraesuis isolate nel corso del presente studio sembrano essere particolarmente rare e non ci risulta che siano mai state isolate prima nel Nord Est Italia (Enter-Vet Report 2010); in particolare *Salmonella* Choleraesuis non è mai stata isolata durante i programmi di sorveglianza sanitaria della fauna selvatica che si svolgono regolarmente da diversi anni nella regione Friuli Venezia Giulia. Le tecniche biomolecolari applicate ai ceppi isolati potrebbero essere di ausilio per chiarire l'epidemiologia di questo evento.

In nessuno degli allevamenti di suini della regione è stata identificata la presenza di *Salmonella* Choleraesuis, né in corso di questo episodio di salmonellosi nel cinghiale né durante un recente studio di prevalenza effettuato presso il nostro Istituto, molto probabilmente in ragione delle misure di biosicurezza adottate anche al fine di evitare il contatto degli animali allevati con altri selvatici.

Ringraziamenti: gli autori ringraziano per la fattiva collaborazione l'Assessorato e il Servizio Caccia e Pesca della Provincia di Pordenone e tutti i cacciatori che hanno contribuito.

## **BIBLIOGRAFIA**

- Cowled B. D., Ward M. P., Laffan S. W., Galea F., Garner M. G., MacDonald A. J., Marsh I., Muellner P., Negus K., Quasim S., Woolnough A. P., Sarre S. D. "Integrating Survey and Molecular Approaches to Better Understand Wildlife Disease Ecology" PLoS ONE; Oct 2012, Vol. 7 Issue 10, Special section p1.
- Enter-Vet Report 2010 [http://www.izsvenezie.it/images/stories/Pdf/salmonellosi/report\\_Enter\\_Vet\\_2010.pdf](http://www.izsvenezie.it/images/stories/Pdf/salmonellosi/report_Enter_Vet_2010.pdf)
- Fedorka-Cray PJ, Gray JT, Wray C "Salmonella infections in pigs". In: Wray C, Wray A (eds) Salmonella in domestic animals. CAB International, Wallingford, pp 1191–1207, 2000
- Paulsen P., Smulders F.J.M., Hilbert F. "Salmonella in meat from hunted game: A Central European perspective"
- Wacheck S., Fredriksson-Ahoma M., Koenig M., Stolle A., Stephan R. "Wild Boars as an Important Reservoir for Foodborne Pathogens". Foodborne Pathog Dis, Vol.7 Issue 3, 2010.
- Zimmerman J.J., Benfield D.A., Murtaugh M.P., Osorio F., Stevenson G.W., Torremorell M., Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (Porcine Arterivirus), Diseases of swine 9th edition, Blackwell Publishing (2006), 387-417.