18-02-2019
Prof. Fratini
Malattie infettive. Esame finale orale in date di appello fissate o in altre, basta organizzarsi.
Materiale didattico: Slides sufficienti da integrare con appunti.
2 seminari, uno su malattie batteriche delle api ed un altro sulla diagnostica molecolare della leptospirosi.

Epidemiologia. Piú semplice. 1 prova scritta con 6 domande aperte (3 pt ciascuno) riferite alla parte teorica + 2 esercizi (6 pt ciascuno). Tutto a fine corso. Eventuale prova orale solo migliorativa. Da sostenere in qualunque momento previo accordo. Oppure solo esame orale in data di esame ma comunque ci sono da svolgere gli esercizi.
Materiale didattico —> Bottarelli e Ostanello. Corso di epidemiologia veterinaria in rete.

SCHEMA DI APPROCCIO ALLE MALATTIE INFETTIVE:

- *Eziologia;*
- *Epidemiologia —> studi gli aspetti relativi alla diffusione della malattia infettiva in un ambiente o in una certa popolazione. Anche vettori, serbatoi, ospiti secondari e paratenici;*
- *Eventuali correlazioni antigeniche con altri patogeni —> ex. Biofilm, struttura complessa che consente ai microrganismi di crescere e di difendersui dall' attacco di agenti esterno che potrebbero inattivarli, all' interno del biofilm prodotto da alcuni batteri altri batteri possono trovare rifugio anch' essi ad esempio questa cosa succede tra le Listerie ma anche tra le Listerie ed altri batteri produttori di biofilm come Pseudomonas;*
- *Patogenesi;*
- *Manifestazioni cliniche generali e di apparato;*
- *Lesioni anatomo-patologiche;*
- *Diagnosi (diretta e indiretta) e diagnosi differenziale;*
- *Terapia (eziologica e sintomatica);*
- *Profilassi (igienicosanitaria e immunizzante).*

master COPY

Ricordiamo che per alcune malattie infettive, in genere quelle caratterizzate da elevata diffusibilitá, é attivo il **regolamento di polizia veterinaria** che risale al 1934 ed é diviso in 3 titoli:
- Nel titolo 1 si parla di norme generali di polizia veterinaria;
- Nel titolo 2 si parla di norme sanitarie speciali da adottare in caso di alcune specifiche malattie infettive e diffusive degli animali;
- Nel titolo 3 abbiamo le disposizioni generali e finali comprese le sanzioni per chi non ha rispettato il regolamento e gli indennizzi per chi ha subito danni.

I primi 16 articoli trattano della modalitá e delle conseguenze della denuncia, l' art. 1 in particolare parla delle **malattia per cui é previsto l' obbligo di denuncia**, ad oggi queste sono 62 tra cui quelle che tratteremo noi.

SALMONELLOSI

Si tratta di **malattie contagiose a decorso acuto, subacuto o cronico, proprie di svariate speci animali domestiche e selvatiche ed anche zoonotiche**. Per lo piú sono caratterizzate dal determinare **processi infiammatori gravi o non, a carico dell' apparato enterico**, non raramente peró possono determinare anche altri quadri anatomoclinici dovuti a batteriemia secondaria con colonizzazione di nuovi distretti, ad esempio per localizzazione a livello dell' apparato riproduttore possiamo avere aborti, o ancora possiamo avere forme settiche acute, mastiti, linfoadeniti, broncopolmoniti o anche quadri inapparenti che si hanno spesso nelle speci selvatiche, anche nel cane inoltre abbiamo spesso infezione senza alcun quadro clinico. La diffusione é mondiale.
La salmonellosi é stata segnalata per la prima volta nel 1886 da Salmon, un medico veterinario americano, dal suo nome deriva il nome del genere "salmonella". Ad oggi **si riconoscono piú di 2500 sierotipi distinti grazie alla struttura del soma batterico** con metodiche sierologiche, soprattutto di agglutinazione rapida. I ceppi piú frequentemente diffusi nell' uomo e negli animali sono:
- **S. ENTERIDIS;**
- **S. TYPHIMURIUM.**

Molte salmonelle sono a spettro ristretto, specializzate nell' infezione esclusiva di alcune specie animali o addirittura selettive verso alcuni apparati, alcune ad esempio determinano esclusivamente aborto.
Le forme di salmonellosi si distinguono in:

- **Forme tifoidee o salmonellosi maggiori** —> Sono dovute a sierotipi specifici che sono **S. Typhi e S. Paratyphi di cui l'uomo é l' unico serbatoio**, hanno caratteristiche di coltura particolari che rendono semplice la loro distinzione. Queste forme cliniche sono caratterizzate da febbre tifoide e forme enteriche;
- **Forme non tifoidee o salmonellosi minori** —> sono dovute a **S. Typhimurium e S. Enteridis, queste sono le speci reponsabili piú frequentemente di forme cliniche, sono recettivi sia l' uomo che gli animali.** La forma clinica prevalente é la manifestazione gastroenterica, tra l' altro nell' uomo sono responsabili di oltre il 50% del totale delle infezioni gastrointestinali e sono una delle cause piú frequenti di infezioni tossiche alimentari nel mondo industrializzato. Serbatoio di infezione sono sia gli animali sia i loro derivati come carne, uova e latte consumato crudo. Altrettanto importante come veicolo di infezione é l' ambiente, anche le acque possono essere contaminate.

CLASSIFICAZIONE DELLE SALMONELLE: **Kauffman nel 1931** propose uno schema di classificazione delle salmonelle ancora oggi in uso ed universalmente accettato. Secondo Kauffman le salmonelle sono un unico genere diviso in 4 sottogeneri formati da numerose specie, a loro volta contenenti diversi sierotipi ai quali sono riconducibili i ceppi.
Una piú recente classificazione risale agli **anni 90 quando Le Minor** considera all' interno del genere Salmonella due solo speci:

- **S. Enterica** —> all' interno della specie Enterica troviamo 6 subspecie
  - **S. Enterica Enterica;**
  - **S. Enterica Salamae;**
  - **S. Enterica Arizonae;**
  - **S. Enterica Diarizonae;**
  - **S. Enterica Houtenae;**
  - **S. Enterica Indica.**
- **S. Bongori**

Le salmonelle fanno parte della famiglia delle **ENTEROBATTERIACEE** dove troviamo Salmonella ma anche Escherichia, Shigella, Citobacter, Klebsiella, Enterobacter. Per differenziare i vari generi si utilizzano delle prove biochimiche, ad esempio Salmonella é negativa alla prova dell' indolo, dell' urea, della beta-galattosidasi mentre é positiva alla prova della lisina decarbossilasi, inoltre possiamo valutare la mobilitá, le salmonelle sono tutte flagellate ad eccezione dei subtipi aviari, producono H_2S e sono positive alla prova di Simmons o prova del citrato.
La salmonella é una **fermentatrice acido-mista** quindi anche in condizione di anaerobiosi fermenta zuccheri producendo acidi diversi. Tutte queste caratteristiche biochimiche ci permettono di capire che il batterio isolato é effettivamente salmonella.

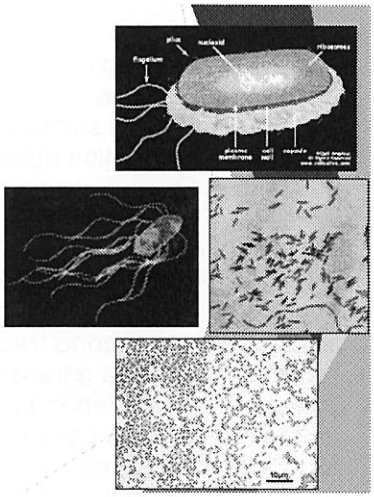
Oggi abbiamo una nuova classificazione delle salmonelle:

Famiglia Enterobatteriaceae;
Genere Salmonella;
Specie Enterica.

Per ragioni diagnostiche continua ad essere valida la classificazione di Kauffman oggi detta **Kauffmann-White** che identifica i sierotipi su base sierologica in base agli antigeni somatici O (lipopolisaccaridi termostabili), antigeni flagellari H (proteici termolabili) e antigene Vi di virulenza.

Un' altra classificazione delle salmonelle le classifica in base allo spettro d' ospite in:

- **Salmonelle a patogenicitá specifica:**
  - Nell' uomo Tiphi e Paratiphi responsabili di tifo e paratifo;
  - S. Pullorum e Gallinarum in uccelli;
  - S. Dublin nel bovino;
  - S. Abortus Equi nel cavallo.
- **Salmonella a patogenicitá aspecifica** o **trasversali** —> colpiscono piú o meno tutti gli animali



EZIOLOGIA: Salmonella é un batterio **Gram - di forma bastoncellare,** di solito mobile per la presenza di flagelli (eccetto le speci dei volatili S. Gallinarum ed S. Pullorum) con numerose ciglia tutte attorno al batterio che servono per l' adesione. **Non sono sporigeni ma sono molto resistenti nell' ambiente, sono acapsulate, aerobie facoltative**.
Da un punto di vista identificativo ricordiamo alcune caratteristiche biochimiche basate o su fermentazioni di zuccheri o sulla verifica della presenza o meno di certi enzimi verificate in genere tramite API sistem:

- *Indolo e ureasi negative (a differenza del Coli);*
- *Catalasi positivi;*
- *Producono idrogeno solforato;*
- *Fermentano il glucosio con produzione di gas;*
- *Non fermentano il lattosio —> alcune lo fermantano in modo molto rallentato se dotate di beta-galattosidasi;*
- *Usano il citrato.*

Sopravvivono ad un range di pH che va da 4,5 a 9 anche se il pH ottimale é tra 6,5 e 7,5 (meglio verso la basicitá che verso l' aciditá). Sopravvivono anche in un range di temperatura ampio che va da 5 a 45 gradi ma la temperatura ideale é di 37 gradi. Non sono tendenti alla psicrofilia (non stanno bene al freddo, a differenza di Listeria che resiste anche a temperature prossime allo 0).
Nel genere salmonella come abbiamo detto sono presenti degli antigeni, utilizzati per la classificazione sierotipica. Abbiamo:

ENTEROBACTERIACEAE: PRINCIPALI PROVE BIOCHIMICHE DIFFERENZIALI

Principali caratteri differenziali	Escherichia	Shigella	Salmonella	Citrobacter	Klebsiella	Enterobacter	Serratia	Proteus	Providencia
indolo	+	+	-	-	-	-	-	+	+
urea	-	-	-	d	+	-	d	+	-
lisina decarbossilasi	d	-	+	-	+	+	+	-	-
beta-galattosidasi (ONPG)	+	d	-	+	+	+	+	-	-
Voges-Proskauer (VP)	-	-	-	-	+	+	+	-	-

Test	Salmonella	Shigella	Escherichia	Citrobacter	Klebsiella	Enterobacter	Proteus	Providencia
Mobilità	+	-	+	+	-	+	+	+
H_2S	+	-	-	+	-	-	+	-
VP	-	-	-	-	+	+	-	-
Lattosio	-	-	+	+	+	+	--	-
Saccarosio	-	-	V	V	+	+	V	V
Citrato (Simmons)	+	-	-	+	+	+	V	+

- **Antigeni somatici O** sono di natura lipopolisaccaridica, termostabili ma poco specifici e poco immunogeni. Ne conosciamo 65 attualmente suddivisi in gruppi distinti in:
- Primi 50 contrassegnati con le lettere maiuscole dell'alfabeto con suddivisioni interne ex C1;
- Oltre la lettera Z con numeri che vanno da 51 a 65.

CARATTERISTICHE BIOCHIMICHE di SALMONELLA

Reazione	Risultato	Reazione	Risultato
produzione di indolo	-	idrolisi dell'urea	-
rosso metile (RM)	+	Voges-Proskauer (VP)	-
riduzione dei nitrati	+	fermentazione glucosio + gas	+
produzione H_2S	+	fermentazione lattosio	-
fermentazione saccarosio	-	fermentazione salicina	-
fermentazione adonite	-	fermentazione mannite	+
fermentazione maltosio	+	fermentazione inosite	-
fermentazione sorbite	+	liquefazione gelatina	-
sviluppo con NH_4 citrato	+	sviluppo con KCN	-

Gli antigeni somatici O possono variare in quanto c' é la possibilitá in cultura che le salmonelle passino dalla fase S alla fase R (diversa conformazione che l' antigene assume che determina che la colonia sia liscia o rugosa) o per mutazione.

- **Antigeni flagellari H**, sono termolabili a circa 70 gradi perché di natura proteica. Sono altamente specifici del genere salmonella ma difficili da isolare per ottenere vaccini. Possono trovarsi in due fase:
- Fase 1 piú specifici ed immunogeni, piú utili per la protezione in termini vaccinali, sono indicati con le lettere minuscole dell' alfabeto;
- Fase 2 sono meno specifici, vengono indicati con numeri arabi.
- **Antigene Vi di virulenza**: Alcune salmonelle (S. Typhi, S. Paratyphi, S. Dublin e S. Typhimurium) presentano anche l' antigene di virulenza Vi, questo é termolabile pur essendo di natura polisaccaridica in quanto si tratta di catene carboidratiche danneggiabili dallla temperatura, inoltre e poco specifico. Qesti antigeni Vi sono piú esterni come posizione rispetto agli antigeni O per cui mascherano gli antigeni somatici e inibiscono l' agglutinazione da parte degli antisieri specifici verso gli antigeni O che sono quelli costruiti per procedere alla tipizzazione della salmonella, chiaramente questo crea problemi nell' identificazione del ceppo, tuttavia anche a

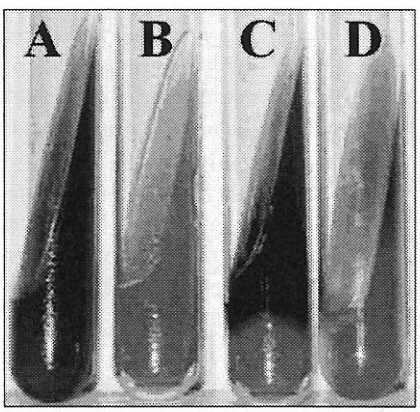
master COPY

temperature piú basse di 60 gradi essi vengono degradati, bisogna saperlo in modo da trattare quindi a 56-58 gradi, calore di scomplementazione, in questo modo si eliminano gli antigeni Vi e si puó ricorrere agli antisieri specifici per scoprire quali sono gli antigeni somatici e caratterizzare la salmonella.

La formula antigenica delle varie sierovarianti di salmonella é costituita quindi da:
- Antigeni O;
- Antigeni H;
- Eventuamente antigene Vi.

CARATTERISTICHE DI RESISTENZA: le salmonelle vengono inattivate a 56 gradi in 10-12 minuti, possono rimanere vitali nell' ambiente anche piú di un anno, soprattutto in stagni, corsi d' acqua, liquami ecc.., possono trasferirsi anche ai gasteropodi acquatici che fungono da vettore passivo e rappresentano una garanzia ulteriore per la loro sopravvivenza. Al loro interno rimangono attive e potenzialmente infettanti ma senza svolgere attivitá metabolica per tantissimo tempo.
La resistenza nelle carni insaccate va da 2 ore fino a 2 mesi in relazione all' activity water Av (quota d' acqua libera, non legata ad enzimi o strutture del soma batterico e del citoplasma, totalmente disponibile per l' attivitá metabolica dell' organismo che diminuisce in maniera progressiva, il fatto che questa possa essere tanta o poca chiaramente influenza la sopravvivenza del microrganismo). I comuni disinfettanti le inattivano in pochi minuti ad esempio i migliori sono tutti i disinfettanti che liberano O2 (acqua ossigenata, acido peracetico, permanganato di K, sali di ammonio ecc...).

EPIDEMIOLOGIA: Gli animali, uomo compreso, rappresentano il serbatoio delle salmonelle mentre il principale veicolo di infezione é rappresentato dagli alimenti. Le salmonelle arrivano nell' ambiente prevalentemente tramite le acque reflue per contaminazione fecale.
La via di trasmissione é oro-fecale ma non deve essere trascurata neppure la trasmissione aerogena in quanto il microrganismo puó sopravvivere nelle particelle di aria secca ed essere da questo veicolato anche in assenza di materiale organico.
Le salmonelle arrivano negli allevamenti prevalentemente tramite uccelli selvatici, roditori che sono fonte importante di infezione per fecalizzazione sia dell' alimento che dell' ambiente e contaminazione dei serbatoi d' acqua, non é tanto il soggetto infetto che manifesta i sintomi clinici la principale fonte di disseminazione dell' infezione, quanto piú il **portatore sano** che é un grande diffusore della malattia. Si tratta di soggetti infetti ma non sono malati che veicolano la salmonella e la eliminano con le feci in maniera intermittente, contaminando l' ambiente. Le principali condizioni che agevolano l' eliminazione e quindi la diffusione delle salmonelle sono le carenze igieniche e tutti fattori di stress tra cui il sovraffollamento e le malattie concomitanti, motivo per cui possiamo porre la salmonellosi tra le **MALATTIE CONDIZIONATE**. I portatori sani possono rimanere tali anche per 2-3 anni. I soggetti giovani sono quelli piú sensibili alla malattia e spesso manifestano i sintomi clinici piú frequentemente rispetto agli adulti.
CARATTERISTICHE COLTURALI: Una volta isolate le salmonelle crescono facilmente su terreni sintetici come l' Agar criptosio (terreno neutro, ricco ma generico che fa crescere quasi tutti i batteri, di solito si fa uno slem lungo), possiamo utilizzare terreni liquidi (TSB, BHI) o terreni liquidi selettivi come brodo selenite (con selenite di Na) o RV Broth (con verde malachite) in cui avremo un intorbidimento uniforme, questi terreni selettivi promuovono la crescita dei Gram - ed eliminano i Gram + il che é importante in quanto derivando il campione da feci o campioni intestinali comunque potrebbe esserci di tutto.
Sui terreni solidi crescono con formazione di colonie rotndeggianti al di sotto dei 2 mm di diametro, covesse, incolori, lisce, lucenti, a margine netto, raramente sono ruvide e opache.
Sui terreni a becco di clarino che ci permette di fare nello stesso terreno sia una semina in aerobiosi che in anaerobiosi danno luogo ad una patina omogenea translucida, cremosa e spesso filante.



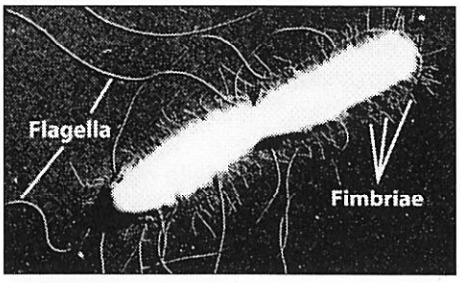
I terreni che si utilizzano maggiormanete sono il **Kligler Iron Agar o TSI agar** preparati a becco di clarino, questi terreni contengono lattosio, fruttosio e glucosio, e ci permettono di capire se c' é o meno la fermentazione degli zuccheri:
- Se non viene fermentato nessuno zucchero il colore rimane rosso inalterato: A —> non é un' enterobatteriacea);
- Se viene fermentato tutto diventa giallo: B —> magari il Coli perché fermenta anche il lattosio;
- Fermentazione degli zuccheri in anaerobiosi con formazione

di idrogeno solforato nero C —> salmonella;
- D potrebbe essere salmonella.

PATOGENESI: l' infezione da salmonella avviene prevalentemente tramite ingestione, a questo punto abbiamo l'adesione e la moltiplicazione nelle cellule intestinali con liberazione di endotossine che sono LPS, si innseca quindi un processo infiammatorio che determina sintomi di ordine generale come febbre, nausea, vomito e dolore addominale.
Possiamo dividere l' infezione da salmonella in varie fasi:
FASE1: invasione del tratto gastroenterico, in generale il tratto intestinale piú colpito é il tratto distale del tenue ed il colon ma in generale puó essere colpito tutto l' intestino eccetto il duodeno.
FASE 2: L' infezione sistemica avviene dopo che nell' intestino tramite le cellule M dell' ileo che sono cellule multifenestrate quindi con molti varchi di ingresso per salmonella, le salmonelle vengono endocitate e trasportate tramite i macrofagi da cui non vengono distrutte ma solo veicolate tramite i vasi linfatici nelle placche del Peyer e nei linfonodi mesenterici e da qui per via linfo-ematogena in organi specifici, soprattutto a livello di fegato e milza dove troviamo ritroviamo rispettivamente le cellule di Kupffer e le cellule della sponda. **Sottolineiamo che non sempre il batterio va in circolo in quanto in genere la salmonella viene attaccata dal SI.**
Sempre per via ematogena o linfoematogena la salmonella puó raggiungere diversi distretti come l'apparato riproduttore dove puó determinare aborto (normalmente succede nel caso di salmonelle abortigene che sono dotate di meccanismi che permettono loro di attraversare in maniera rapida la 1 fase e di arrivare subito in fase 2 sistemica) oppure possono localizzarsi a livello muscolare ed anche nel miocardio, a livello delle articolazioni (soprattutto certi sierotipi), a livello del cervello ecc.. a seguito della fase sistemica possiamo avere tre esiti in relazione all' etá ed all' immunocompetenza dell' ospite:
- **Eliminazione dell' infezione;**
- **Stato di portatore;**
- **Morte dell' animale**.

FASE 3: é una fase di resistenza all' infezione, in genere negli animali resistenti si ha un controllo della replicazione dei batteri grazie al sistema immunitario innato, i macrofagi infatti quando le salmonelle arrivano nelle placche del Peyer le confinano arginandole nella colecisti dove abbiamo un'azione batteriostatica da parte dei componenti della bile. Questi soggetti diventeranno serbatoi dell' infezione.
Se invece l' infezione non viene controllata adeguatamente dal SI innato allora la salmonella replica a livello di fegato e milza determinando epatomegalia e splenomegalia con la formazione di piccole lesioni a causa di citotossine prodotte dalle salmonelle stesse. Le salmonelle possiedono diversi fattori di patogenicitá codificati dal genoma stesso delle salmonelle nelle **ISOLE DI PATOGENICITÁ** (3 sono le principali ma in totale sono 5):
- **Sistema di difesa che consente di resistere temporaneamente al pH gastrico**.
- **Fattori che intervengono nella colonizzazione dell' intestino favorendo la loro adesione alla mucosa**;
- **Fattori che consentono di attraversare l' epitelio intestinale e di sopravvivere nei macrofagi,** ad esempio enzimi per l'inattivazione degli enzimi litici del fagolisosoma o enzimi che inibiscono la formazione stessa del fagolisosoma;
- **Fattori di antibiotico-resistenza**.

Ricordiamo che nelle salmonelle **la lunghezza della catena laterale O e il grado di glicosilazione dela catena sono connessi alla virulenza del batterio,** c' é infatti un ingombro sterico che fisicamente impedisce il legame del complemento e quindi la lisi batterica, quindi maggiore é la sua lunghezza, minore sará la possibilitá di lisi batterica con aumento della virulenza.
Altri fattori di patogenicitá importante sono poi da considerarsi i **flagelli** e le **fimbrie**, ne esistono diverse tipologie che determinano una minore o maggiore capacitá di adesione permettendo al batterio di resistere alla motilitá intestinale, ricordiamo poi la presenza della **flora batterica intestinale** che crea una sorta di competizione con i batteri patogeni come le salmonelle sia per l' attacco alla mucosa intestinale sia per l' utilizzo delle componenti alimentari, infine a scopo protettivo nell' organismo animale sono



FIMBRIE DI SALMONELLA