

INDAGINE MICROBIOLOGICA SU BORRE DI RAPACI

Dipineto L.¹, Pace A.¹, De Luca Bossa L.M.², Russo T.P.¹, Varriale L.¹, Gargiulo A.², Borrelli L.¹, Raia P.², Fioretti A.¹

¹Dipartimento di Medicina Veterinaria e Produzioni Animali, Università di Napoli Federico II, via della Veterinaria 1, 80137 Napoli; ²Centro di Recupero Animali Selvatici, Via M. Rocco di Torrepadula, Napoli, Italy

Summary

Seventy birds of prey pellets belonging to different species and housed at the Wildlife Rescue and Rehabilitation Center of Napoli were collected and microbiologically analyzed by culture and biochemical methods as well as by serotyping and polymerase chain reaction. Pellets examined contained a wide range of microorganism, some of them potentially zoonotic (i.e. *Salmonella* Typhimurium, *Campylobacter coli*, *Escherichia coli* O serogroups). This study confirms the role of birds of prey as a potential asymptomatic carrier of pathogenic bacteria which could be disseminated in the environment not only through the birds of prey feces but also through their pellets.

INTRODUZIONE

La borra è un rigurgito, contenente residui alimentari non digeriti, prodotto da diversi uccelli; è importante per favorire l'espulsione dei resti indigesti di cibo rappresentati, nei rapaci, soprattutto da penne, ossa e pelliccia della preda (Taberlet & Fumagalli, 1996). Le borre, inoltre, potrebbero veicolare agenti patogeni quali virus e batteri rappresentando così un rischio per la salute animale e umana. A tal riguardo, infatti, sono stati segnalati focolai di salmonellosi in due scuole elementari negli USA associate alla dissezione di borre di rapaci (Smith *et al.*, 2005). Il presente studio, pertanto, è stato condotto con lo scopo di effettuare un'indagine microbiologica su borre di rapaci con particolare riferimento a batteri con carattere zoonotico.

MATERIALI E METODI

Campionamento

Nel corso degli anni 2012/2014 sono stati esaminati 70 rapaci appartenenti a differenti specie e ospitati presso il Centro di Recupero Animali Selvatici (CRAS) di Napoli. In particolare, i rapaci erano rappresentati da Gheppio comune (*Falco tinnunculus*; n=25), Falco pellegrino (*Falco peregrinus*; n=13), Poiana (*Buteo buteo*; n=12), Sparviere (*Accipiter nisus*; n=6), Barbagianni (*Tyto alba*; n=5), Allocco (*Strix aluco*; n=4), Gufo reale (*Bubo bubo*; n=2), Gufo di palude (*Asio flammeus*; n=2), Biancone (*Circaetus gallicus*; n=1). Ciascun volatile veniva temporaneamente posto in una scatola dalla quale, al momento del rigurgito, veniva prelevata la borra mediante l'ausilio di un telo chirurgico sterile posizionato sul fondo. Il campionamento avveniva, per la maggior parte dei rapaci, il giorno del ricovero e prima della somministrazione di eventuali farmaci. Ciascuna borra veniva pesata e suddivisa in 5 parti uguali.

Isolamento e identificazione

Le sezioni di borre venivano inoculate in buffered peptone water (BPW), *Campylobacter*-selective enrichment broth (CSEB), cooked meat medium (CMM), modified tryptone soya broth (MTSB), phosphate buffered saline (PBS). I campioni inoculati in BPW venivano incubati a 37 °C per 24 ore e poi seminati in Rappaport-Vassiliadis broth (RV) nonché su Columbia blood agar base (CBA; Oxoid), *Pseudomonas* cetrimide agar (PCA; Oxoid), MacConkey agar (MCA; Oxoid) e Baird-Parker agar (BPA; Oxoid). I campioni inoculati in MTSB venivano incubati a 37 °C per 24 ore e poi seminati su sorbitol MacConkey agar (SMCA; Oxoid). I campioni inoculati in CSEB venivano incubati in atmosfera microaerofila a 42 °C per 48 ore e poi seminati su *Campylobacter* blood-free selective agar (CBFA; Oxoid). I campioni inoculati in CMM venivano, invece, incubati in anaerobiosi a 37 °C per 24 ore e poi piastrati su anaerobe basal agar (ABA; Oxoid). I campioni inoculati in PBS erano incubati a 4 °C per 14 giorni e poi seminati su *Yersinia* selective agar base (cefsulodin-irgasan-novobiocin, CIN Agar; Oxoid) e incubati a 30 °C per 24–48 ore. Le piastre di CBA, PCA, MCA, SMCA, CEOA e BPA venivano incubate a 37 °C per 24–48 ore, mentre RV veniva incubato a 42°C per 24–48 ore e poi piastrato su xylose lysine desoxycholate agar (XLD) e brilliant green agar (BGA); le piastre CBFA venivano incubate in microaerofilia a 42 °C per 24-48 ore, mentre le piastre ABA erano incubate in anaerobiosi a 37 °C per 48 ore e valutate giornalmente, per una settimana, prima di eliminarle. Tutti gli isolati venivano preventivamente identificati sulle basi delle loro caratteristiche morfologiche, di esigenze di crescita, colorazione di Gram, test di motilità e produzione di pigmenti, nonché mediante test biochimici e fenotipici convenzionali. Successivamente, gli isolati venivano identificati biochimicamente mediante i sistemi API 20 E, API 20 NE (bioMerieux, Mercy-l'Etoile, France) and RapID ANA II, RapID NF PLUS, RapID STAPH PLUS (Oxoid). I ceppi di *Escherichia coli* venivano sottoposti a sierotipizzazione mediante antisieri poli- e monospecifici (Sifin), mentre *Salmonella* veniva sierotipizzata in collaborazione con il Centro di referenza nazionale e Laboratorio di referenza OIE per le salmonellosi (IZSve, Legnaro, PD). Infine, i ceppi di *Campylobacter* spp. venivano identificati mediante PCR come suggerito da Gargiulo *et al.* (2008).

RISULTATI

Le borre analizzate presentavano un'ampia varietà di batteri, spesso isolati contemporaneamente dalla stessa borra. Tra i batteri Gram negativi, *E. coli* veniva isolato da 47/70 (67,1%) borre esaminate e sierotipizzato nei sierogruppi O26 ($n=8$), O55 ($n=2$), O103 ($n=13$), O145 ($n=6$), O164 ($n=4$); i rimanenti ceppi venivano identificati come *E. coli* generici. *Salmonella* spp. veniva isolata da 2/70 (2,9%) borre e sierotipizzata come *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Campylobacter* spp. veniva isolato da 25/70 (35,7%) borre e identificato come *C. coli*. Inoltre, venivano isolati *Enterobacter cloacae* (18/70; 25,7%), *c* (19/70; 27,1%), *Citrobacter freundii* (23/70; 32,9%), *C. brakii* (2/70; 2,9%), *C. youngae* (2/70; 2,9%), *Klebsiella pneumoniae* (11/70; 15,7%), *Achromobacter xylosoxidans* (9/70; 12,9%); *Alcaligenes faecalis* (2/73; 2,9%). Non si isolavano, invece, *Pseudomonas* spp. e *Yersinia* spp. Per quel che concerne i batteri Gram positivi, *Staphylococcus* spp. veniva isolato da 61/70 (87,1 %) borre e identificato come *S. aureus* ($n=26$); i rimanenti ceppi venivano identificati come stafilococchi coagulasi-negativi. I

batteri anaerobi venivano ritrovati in basse percentuali. Nello specifico, si isolavano *Fusobacterium necrophorum* (7/70; 10,0%), *Clostridium perfringens* (4/70; 5,7%), *Bacteroides* spp. (3/70; 4,3%).

DISCUSSIONE

Recentemente, le borre sono state impiegate in vari studi inerenti la biologia, la tafonomia e l'ecologia (Terry, 2004; Scheibler & Christoff, 2007). Tuttavia, studi sulla microbiologia delle borre sono scarsi e concernenti segnalazioni aneddotiche (Smith *et al.*, 2005). Nella presente indagine, i microrganismi maggiormente isolati dalle borre appartenevano alla famiglia delle Enterobacteriaceae, seguiti da *Staphylococcus* spp. e dai batteri anaerobi. In particolare, sono stati identificati dodici generi di batteri, la maggior parte dei quali considerati potenzialmente zoonotici (*i.e.* *S. Typhimurium*, *C. coli*, *E. coli* sierogruppo O) oppure opportunisti (*e.g.* *K. pneumoniae*, *S. aureus*, *C. perfringens*) per l'uomo. Un ritrovamento interessante è stato l'isolamento di *S. Typhimurium* che, per quanto riscontrata in basse percentuali (2,9%), conferma le borre come potenziale fonte di infezione per l'uomo come anche dimostrato dallo studio di Smith *et al.* (2005) che riportava epidemie da *Salmonella* spp. in seguito al contatto con borre di rapaci. Non è stato possibile indagare sulle fonti di contaminazione delle borre sebbene l'alimentazione sembri l'ipotesi più plausibile come anche dimostrato da uno studio condotto da Kirkwood *et al.* (1994) in cui, lo stesso fagotipo di *S. Enteritidis*, veniva isolato sia da campioni fecali di rapaci che dai pulcini utilizzati per la loro dieta.

CONCLUSIONI

In virtù dell'ampia varietà di batteri isolati, pertanto, il presente studio evidenzia il possibile ruolo dei rapaci come carrier asintomatici di batteri potenzialmente patogeni, in grado di diffonderli nell'ambiente non solo attraverso le loro feci ma anche mediante le loro borre.

BIBLIOGRAFIA

1. Gargiulo A., Rinaldi L., D'Angelo L., Dipineto L., Borrelli L., Fioretti A., Menna LF. (2008). Survey of *Campylobacter jejuni* in stray cats in southern Italy. *Lett. Appl. Microbiol.* 46: 267–270
2. Kirkwood JK, Cunningham AA, Macgregor SK, Thornton SM, Duff JP. (1994). *Salmonella enteritidis* excretion by carnivorous animals fed on day-old chicks. *Vet. Rec.* 134: 683
3. Scheibler DR, Christoff AU. (2007). Habitat associations of small mammals in southern Brazil and use of regurgitated pellets of birds of prey for inventorying a local fauna. *Braz. J. Biol.* 67: 619–625
4. Smith KE, Anderson F, Medus C, Leano F, Adams J. (2005). Outbreaks of salmonellosis at elementary schools associated with dissection of owl pellets. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 5: 133–136
5. Taberlet P, Fumagalli L. (1996). Owl pellets as a source of DNA for genetic studies of small mammals. *Mol. Ecol.* 5: 301-5.
6. Terry RC. (2004). Owl pellet taphonomy: a preliminary study of the post-regurgitation taphonomic history of pellets in a temperate forest. *Palaios* 19: 497–506