

Mangime commerciale disidratato all'origine di un focolaio di salmonellosi sostenuto da diversi sierotipi in un canile municipale in Toscana

Marco Selmi⁽¹⁾, Simonetta Stefanelli⁽²⁾, Stefano Bilei⁽²⁾, Rita Tolli⁽²⁾, Luigi Bertolotti⁽³⁾, Paola Marconi⁽²⁾, Stefano Giurlani⁽¹⁾, Pier Giorgio De Lucia⁽¹⁾, Gianfranco Ruggeri⁽¹⁾ & Ambrogio Pagani⁽¹⁾

Riassunto

Il lavoro descrive un importante focolaio di salmonellosi in cani ospitati in un canile municipale. Durante il focolaio, 174 campioni di feci "diarroiche" e "normali" e due lotti di mangime in uso al canile, sono stati sottoposti ad analisi per la ricerca di *Salmonella*. Venticinque cani su 41 (60,9%), sono risultati positivi ad almeno una coprocultura, con una incidenza per campionamento compresa tra il 12,5 ed il 34%. Nove campioni di mangime su 10 sono risultati positivi. In totale, nei campioni di feci e di mangime, sono stati isolati 10 differenti sierotipi di *Salmonella*: l'identificazione mediante *pulsed-field gel electrophoresis* (PFGE), ha riportato un'elevata similarità nell'ambito del sierotipo, tra gli isolati da feci e mangime di *Salmonella* Montevideo, Muenster e Worthington.

Parole chiave

Cane, Canile, Canina, Italia, Mantel's test, PFGE, *Pulsed-field gel electrophoresis*, *Salmonella*, Salmonellosi.

Introduzione

Le salmonelle sono microorganismi Gram-negativi, mobili, non sporiformi ed aerobi, appartenenti alla famiglia delle Enterobacteriaceae. Ad oggi, più di 2.500 sierotipi di

Salmonella sono stati associati a malattie umane ed animali (9).

Nel cane episodi di eliminazione di *Salmonella* con le feci sono comuni, frequentemente causati da ingestione di cibo contaminato e di carogne di animale o da coprofagia (2, 15). Al contrario i casi clinici sono piuttosto rari e si osservano nei cuccioli ed in cani ospitati in canili, con febbre (40°C-41.1°C), anoressia, diarrea con o senza tracce di sangue, dolore addominale ed aborto (14). I cani infetti eliminano il patogeno attraverso le feci per 6 o più settimane, in modo costante nelle prime settimane ed intermittente in seguito (14) e se asintomatici rappresentano una potenziale fonte di contagio per altri cani e per l'uomo.

Nei canili, gli animali sono generalmente alimentati con derivati animali crudi o non trattati, diete casalinghe o mangimi commerciali. I primi sono considerati un importante fattore di rischio per l'infezione da *Salmonella* come è stato ampiamente dimostrato (2, 7), poiché la materia prima utilizzata può avere diverse origini ed in genere non è sottoposta ad alcun trattamento termico che la sterilizzi da eventuali patogeni presenti, mentre generalmente il cibo disidratato è considerato più sicuro, più facile da somministrare e da conservare. Tuttavia è possibile anche in questo tipo di alimento

(1) U.F. Sanità Pubblica Veterinaria, Azienda Sanitaria Locale 2 di Lucca, Via di Tiglio, Carraia, 55061 Lucca, Italy
m.selmi@usl2.toscana.it

(2) Istituto Zooprofilattico Sperimentale Lazio e Toscana, via Appia Nuova 1411, 00178 Rome, Italy

(3) Dipartimento di Produzioni Animali, Epidemiologia ed Ecologia, Facoltà di Medicina Veterinaria Università degli Studi di Torino, Via Leonardo da Vinci, 44, 10095 Grugliasco (TO), Italy

riscontrare la presenza di *Salmonella*, qualora la disidratazione non abbatta completamente la carica microbica presente nei derivati animali che lo compongono o criticità nella procedura di produzione consentano una contaminazione dall'ambiente e da lavoratori infetti o portatori. Ed infatti è stato dimostrato che anche il mangime disidratato può essere una fonte di infezione da *Salmonella* in canili (18) e che la manipolazione di tali prodotti costituisce una potenziale fonte di infezione per l'uomo (1, 3, 19). Questo ultimo aspetto dovrebbe essere tenuto presente nello svolgimento di indagini epidemiologiche in focolai di salmonellosi umana.

In Italia non sono mai stati condotti studi approfonditi sulla prevalenza di infezione da *Salmonella* nei canili. Tuttavia Corradini (5), ha isolato 30 diversi sierotipi di *Salmonella* sul 7,16 % di un totale di 2.138 campioni di feci di cane. Prevalenze del 15% sono state riportate da altri autori stranieri (8). La prevalenza di infezione da *Salmonella* in un canile è estremamente varia (8, 14) e dipende dal tipo di dieta, dalle caratteristiche strutturali (densità dei cani, disponibilità di aree comuni, presenza di stanze di isolamento, ecc.) e dalla conduzione del canile (cure mediche, programmi sanitari, check-up in entrata).

Il presente lavoro si riferisce allo studio di un focolaio di salmonellosi in un canile municipale che ha evidenziato un inatteso rischio sanitario di infezione multipla (causata dalla contemporanea presenza di diversi sierotipi) in cani alimentati con mangime commerciale disidratato. I cluster spazio-temporale dei casi ed i profili di restrizione identificati per mezzo della *pulsed-field gel electrophoresis* (PFGE), sono stati analizzati per stabilire il grado di similarità tra i medesimi sierotipi isolati nella dieta e quelli circolanti nel canile e per definire i meccanismi di infezione che hanno caratterizzato il focolaio.

Materiali e metodi

Anamnesi

Il canile municipale di Lucca è una struttura moderna (Figura 1), costituita da 36 box solitamente utilizzati per ricovero individuale

e diversi annessi tra cui locali di isolamento e svezzamento ed uno sgambatoio su manto erboso. La struttura ha funzione di canile sanitario per sette comuni della zona Piana di Lucca ed ospita una media di 300 cani/anno. Attualmente il canile è gestito dall' *Ente Nazionale Protezione Animali*.



Figura 1
Il canile municipale di Lucca nel nord ovest della Toscana

Nel Dicembre 2007 diversi cani ospitati nel canile manifestarono diarrea profusa, spesso emorragica, senza altri segni clinici. Le analisi di routine per la ricerca di parassiti intestinali risultarono negative. Successivamente, il 31 Dicembre, venne eseguito un ulteriore campionamento di feci di 5 cani sintomatici, dei quali 4 risultarono positivi per *Salmonella*.

Al momento della denuncia ufficiale di focolaio (10 Gennaio 2008) nel canile erano ospitati 41 soggetti, dei quali 35 ricoverati individualmente, ma 3 ricoveri (la cella n. 3 ed i locali CP e CA), ospitavano due cani (Figura 2). Tutti i soggetti vennero posti in isolamento nei propri ricoveri.

Raccolta dei campioni

Durante lo studio furono effettuate 4 sessioni di campionamento su feci (inclusi sangue e muco se presenti) ogni 15 giorni, dal 31 Dicembre 2007 al 26 Marzo 2008, raccogliendo il materiale direttamente dal pavimento delle celle utilizzando la palettina del contenitore sterile e refrigerando i campioni per un periodo non superiore alle 24 ore prima della consegna al laboratorio. Nei ricoveri che al

momento ospitavano 2 cani, i campioni furono raccolti come pool e nel caso di positività alla coltura, entrambi i soggetti furono considerati eliminatori del microorganismo.

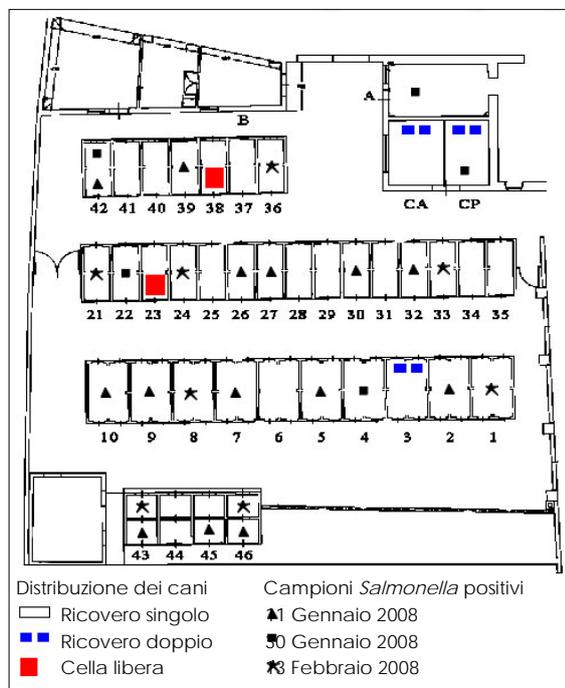


Figura 2

Localizzazione dei cani positivi per *Salmonella*
La cronologia dei campionamenti con esito positivo è riportata per ogni ricovero
Le unità identificate con A, B, CA e CP, sono utilizzate come locali di isolamento o nursery

Due differenti lotti del mangime commerciale disidratato in uso, vennero campionati da confezioni chiuse, in data 11 Gennaio e 14 Febbraio. Il primo lotto si riferiva a mangime somministrato dal 25 Dicembre al 7 Febbraio ed il secondo, al mangime somministrato dall'8 al 13 di Febbraio. Per il campionamento del mangime sono stati seguiti le indicazioni contenute nell'All. VII del Reg. CE 1774/2002 (6), prelevando aseptivamente con sonda 5 aliquote da altrettante confezioni originali integre e costituendo una unica aliquota omogenea di almeno 200 g., poi inviata al laboratorio in contenitori sterili. Precedente-mente al 25 Dicembre, era stato utilizzato un diverso lotto di mangime, sempre della stessa ditta, che non è stato possibile campionare in quanto esaurito al momento del sopralluogo.

In contemporanea a queste operazioni, sono stati eseguiti esami coproculturali su tutto il personale operante presso il canile, compresi i veterinari.

Identificazione e sierotipizzazione

I campioni di materiale fecale sono stati posti in coltura per *Salmonella* secondo gli standard indicati nel *Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals* (21). L'isolamento di *Salmonella* dal mangime è stato effettuato in conformità alla norma ISO 6579:2002 (10) e ISO 6579:2002/Amd 1:2007 (11). Tutti i ceppi sono stati sottoposti ad identificazione biochimica, utilizzando sistemi miniaturizzati del commercio (BIOMERIEUX API 20E) e sierologica, con antisieri del commercio per la ricerca di antigeni, secondo lo schema White-Kauffmann-Le Minor.

Gli isolati di *Salmonella* sono stati sierotipizzati e testati per la sensibilità verso 14 antibiotici secondo gli standard stabiliti dal *Clinical and Laboratory Standards Institute* (4).

La metodica utilizzata per la *pulsed-field gel electrophoresis* (PFGE) è quella in uso presso i Centers of Disease Control (CDC), nell'ambito del progetto Pulse-Net (17), che utilizza l'enzima di restrizione XbaI. I profili di PFGE sono stati analizzati utilizzando il software Bionumerics versione 4.1 (Applied Maths, Sint Martens-Latem, Belgium), con tolleranza ed ottimizzazione dell'1%. Come standard è stato utilizzato il ceppo di *Salmonella* Braenderup (ATCC H9812). La similarità tra ceppi, calcolata dal software secondo il coefficiente di Dice è stata confrontata, costituendo i dendrogrammi con il metodo dell'appaiamento (UPGMA). I pulsotipi sono stati considerati altamente correlati con un indice di similarità (IS) superiore all'80%, secondo gli standard di lavoro in uso al Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie ed Immuno-mediate, dell'Istituto Superiore di Sanità di Roma.

Analisi statistiche

Per valutare la correlazione spazio-temporale tra i casi è stato utilizzato il test di Mantel (13), confrontando matrici basate sulla distanza spaziale (in metri) e temporale (in giorni) tra caso e caso più prossimo.

Sesso, taglia e stato di proprietà degli animali sono stati valutati come fattori di rischio, utilizzando il test del chi-quadro.

Tutti i test statistici sono stati realizzati utilizzando il software R (16).

Risultati

Durante il focolaio il canile è stato chiuso ed i cani posti in isolamento nelle rispettive celle. Sono state adottate ufficialmente procedure operative idonee al controllo di patologie a trasmissione oro-fecale, allo scopo di minimizzare il rischio di trasmissione tra cani e tra cani ed uomo.

Durante la sessione di studio campioni di feci "diarroiche" o "normali" sono stati sottoposti a coltura per la ricerca di batteri patogeni. Ventiquattro ricoveri su 36 e 25 cani su 41 sono risultati, almeno una volta positivi per *Salmonella* (rispettivamente 66.6%; IC 50.7-82.3 e 61.0%; IC 44.5-75.8). La prevalenza di infezione per seduta di campionamento è risultata compresa tra il 12.5 ed il 34%. I cani sono stati trattati oralmente con Enrofloxacin (5 mg/Kg per 5 gg.). I soggetti ritestati dopo 10 gg dalla conclusione del ciclo di terapia, hanno dimostrato una buona risposta al trattamento. La distribuzione dei casi positivi è riportata in Figura 2.

Tabella I

Descrizione dei sierotipi di *Salmonella* identificati nelle feci e nel mangime (31 December 2007-27 February 2008)

Data di identificazione	Sierotipi di <i>Salmonella</i>	
	Sessione di campionamento su feci	Sessione di campionamento su lotti di mangime
31 Dicembre	S. Isangi	
11 Gennaio	S. Give S. Livingstone ⁽¹⁾	S. Thompson S. Anatum S. Montevideo ⁽²⁾ S. Muenster ⁽³⁾
30 Gennaio	S. Livingstone ⁽⁴⁾ S. Montevideo ⁽⁵⁾	–
13-14 Febbraio	S. Derby S. Worthington ⁽⁶⁾ S. Montevideo ⁽⁷⁾ S. Muenster ⁽⁸⁾	S. Worthington ⁽⁹⁾ S. Livingstone ⁽¹⁰⁾ S. Seftemberg
27 Febbraio	<i>Salmonella</i> -negativo	Introduzione di un nuovo tipo di mangime disidratato

Descrizione dei diversi ceppi di sierotipi cronologicamente isolati da feci e mangime
Il valore in apice è la "chiave" che riferisce al codice ID della Figura 3

Entrambi i lotti di mangime disidratato in uso al canile (9 campioni su 10) hanno fatto registrare positività per *Salmonella*.

In totale, da 174 campioni di feci e 10 di mangime, sono stati identificati 10 diversi sierotipi. Nei campioni di feci sono stati ottenuti 4 diversi isolati di *S. Livingstone*; 3 di *S. Montevideo* e *S. Worthington*; 2 di *S. Muenster*; 1 di *S. Derby*, *S. Give* e *S. Isangi*. Dal mangime sono stati ottenuti 6 diversi isolati di *S. Thompson*; 3 di *S. Montevideo*; 2 di *S. Anatum* e *S. Seftemberg*; 1 di *S. Livingstone*, *S. Muenster* e *S. Worthington*. La completa identificazione dei sierotipi è riportata in Tabella I, mentre la similarità tra i profili di restrizione ottenuti con la PFGE è riportata in Figura 3.

I ceppi isolati non hanno mostrato antibiotico-resistenza individuale, ad eccezione di *Salmonella* sierotipo Worthington isolata da feci, che ha mostrato resistenza multipla ad ampicillina, cloranfenicolo, streptomina, sulfisoxazolo, trimetoprin-sulfametoxazolo e tetracicline.

Non è stata osservata alcuna associazione tra cani positivi rispetto a sesso, taglia e stato di proprietà (test chi-quadro, $p>0,05$). Né è stata osservata una correlazione spazio-temporale tra i casi, a conferma dell'assenza di una diretta trasmissione tra i cani (test di Mantel, $p>0.05$).

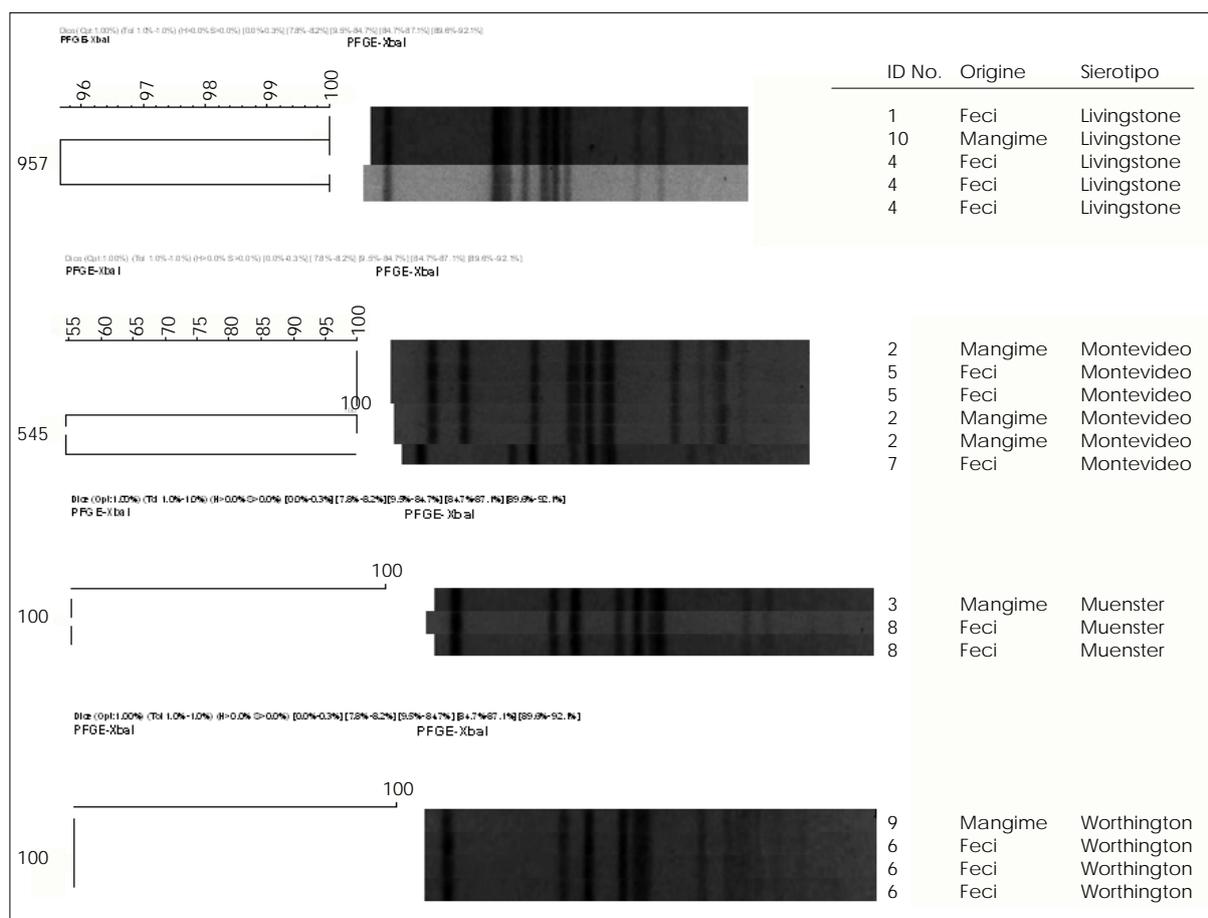


Figura 3
Confronto dei profili alla PFGE degli isolati di salmonella da feci e da mangime
Il codice ID identifica i diversi ceppi isolati in ordine cronologico nelle sessioni di campionamento

I risultati delle coproculture eseguite su personale lavorante presso il canile sono stati costantemente negativi.

Discussione

I risultati riportano la presenza di differenti sierotipi di *Salmonella* nelle feci e nel mangime. La PFGE ha dimostrato similarità per i sierotipi Muenster, Worthington, Montevideo e Livingstone isolati sia da campione di feci che da mangime.

Per *Salmonella* sierotipo Muenster, Worthington e Montevideo si è trattato di identità completa con indice di similarità (IS) del 100% mentre per il sierotipo Livingstone e per un solo ceppo di *S. Montevideo* isolato dalle feci, rispettivamente del 95.7 e del 54.5%. Poiché i pulsotipi sono stati considerati altamente correlati per IS superiore all'80% e

considerando che il sierotipo Livingstone è stato isolato dalle feci prima che il lotto riscontrato contaminato fosse in uso al canile, è possibile confermare che il mangime disidratato è stato la fonte di contagio tra i cani di *Salmonella* dei soli sierotipi Muenster, Worthington e Montevideo. Non è stato tuttavia possibile definire associazioni di causalità per ogni sierotipo. Infatti i sierotipi Give, Derby ed Isangi ed un diverso pulsotipo di Montevideo (IS = 54.5%), sono stati isolati nelle feci ma non nel mangime, mentre i sierotipi Anatum, Seftenberg e Thompson, sono stati isolati dal mangime ma non dalle feci. Per il caso del solo isolamento da feci si può ipotizzare che i ceppi fossero già circolanti nel canile come ceppi saprofitici nei cani (20) o presenti in lotti di mangime precedentemente in uso e non testati come molto probabilmente accaduto per i ceppi di *S. Livingstone* con IS

del 100% rispetto a quello isolato successivamente dal mangime, infine, che l'alto livello di contaminazione qualitativa osservato nei due lotti esaminati, non abbia permesso l'isolamento di tutti i sierotipi presenti.

Nel caso del solo isolamento da mangime si può ipotizzare una minor probabilità di eliminazione per alcuni sierotipi, come è riportato per *Salmonella* Thompson (7), oppure una scarsa virulenza dei tre sierotipi per la specie canina e/o l'incapacità di colonizzare l'intestino, o una loro presenza come frazione non significativa della carica microbica totale. La sola presenza nel mangime potrebbe anche essere interpretata come un falso-negativo alla coprocultura, considerato che la frequenza di campionamento adottata (ogni 15 gg.) non fosse adeguata a rilevare la presenza di microorganismi in caso di eliminazione intermittente.

Confrontando gli isolati di *Salmonella* Worthington da feci e da mangime, è emersa una differenza tra i profili di sensibilità antimicrobica, che può essere spiegata ipotizzando il trasferimento di geni di resistenza da parte di virus o di batteri presenti nel tratto intestinale del cane. Benché in questo studio non siano state effettuate indagini sulla caratterizzazione genetica dei fattori di virulenza per *Salmonella*, appare tuttavia evidente che sia avvenuta una colonizzazione enterica con sierotipo Worthington non-resistente nei cani, la successiva acquisizione in loco di plasmidi di resistenza ed infine l'eliminazione con le feci del sierotipo modificato. Rispetto a quanto già noto sui rischi per l'uomo di acquisire un'infezione da *Salmonella* spp. attraverso animali portatori e relativi ambienti e prodotti di origine animale, questo risultato individua un insidioso rischio addizionale. La tipizzazione molecolare ha dimostrato la relazione causale tra gli isolati di mangime e feci avvalorando il risultato del test di Mantel, un metodo statistico introdotto per localizzare l'origine della fonte inquinante, dimostrando così l'assenza di correlazione spazio-temporale nel succedersi dei casi di salmonellosi in questo focolaio.

La possibilità di escludere una trasmissione diretta dell'infezione tra cani permette alcune

considerazioni relative al tasso di eliminazione fecale e alla carica microbica nel mangime. Premesso che in questo studio non sono state effettuate valutazioni sulla carica microbica dei mangimi in uso, si ritiene tuttavia possibile una sua stima indiretta, sulla base delle seguenti premesse: 1) esiste una diretta correlazione tra tasso di eliminazione fecale e carica microbica degli alimenti; 2) il trattamento antibiotico è risultato efficace ed è stato somministrato all'intera popolazione del canile; 3) l'incidenza osservata nella popolazione del canile (cioè la positività riscontrata), successivamente al trattamento antibiotico, corrisponde al tasso di eliminazione fecale.

Pertanto nel nostro caso il tasso di eliminazione, considerando gli intervalli di confidenza per il primo e secondo campionamento, è compreso rispettivamente tra valori di 2%-23% e 19%-49%. Questi range includono valori descritti da altri autori in studi su cani alimentati con dieta casalinga e con carni crude (7, 12) ed il risultato ottenuto, che stima per un mangime disidratato una carica microbica totale paragonabile a quella di un alimento non processato, è indubbiamente inatteso.

Conclusioni

In seguito al consumo di mangime contaminato con *Salmonella*, i cani hanno eliminato il microorganismo per circa 2 settimane. È stato notato che alcuni sierotipi si adattano particolarmente al cane, che agisce come amplificatore e fonte di contagio per l'uomo, talvolta modificando i profili di resistenza dei sierotipi. Questo risultato suggerisce che i cani possono avere un ruolo attivo nella trasmissione di infezioni da *Salmonella* all'uomo. Il sierotipo Worthington isolato dal cane è risultato resistente al trimetoprim-sulfametossazolo, un farmaco che in Italia è tuttora utilizzato come seconda scelta nel trattamento di infezioni intestinali in fascia pediatrica, un aspetto importante in Sanità Pubblica, perché potrebbe complicare il management delle salmonellosi umane.

I risultati ottenuti dimostrano la relazione epidemiologica tra i casi osservati e l'introduzione di mangime contaminato come unica fonte di trasmissione di *Salmonella* tra i cani del canile; nel contempo il rischio di trasmissione diretta tra cani è risultato trascurabile o ben controllabile introducendo appropriate strategie sanitarie.

In seguito alla notifica del focolaio, l'ASL di competenza ha condotto indagini ufficiali nell'impianto di produzione del mangime. I colleghi hanno comunicato il risultato dei controlli ufficiali e di autocontrolli effettuati

nello stabilimento: la contaminazione non riguardava le materie prime utilizzate per la produzione di mangime, bensì il prodotto finale, individuando quindi criticità nella filiera di produzione. Le azioni correttive successivamente introdotte hanno rimosso tali criticità permettendo di ottenere lotti di mangime non contaminato.

Bibliografia

1. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) 2008. Multistate outbreak of human *Salmonella* infections caused by contaminated dry dog food – United States, 2006-2007. *MMWR*, **57**, 521-524.
2. Chengappa M.M., Staats J., Oberst R.D., Gabbert N.H. & McVey S. 1993. Prevalence of *Salmonella* in raw meat used in diets of racing greyhounds. *J Vet Diagn Invest*, **5**, 372-377.
3. Clark C., Cunningham J., Ahmed R., Woodward D., Fonseca K., Isaacs S., Ellis A., Anand C., Ziebell K., Muckle A., Sockett P. & Rodgers F. 2001. Characterization of *Salmonella* associated with pig ear dog treats in Canada. *J Clin Microbiol* **39**, 3962-3968.
4. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 2008. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals. Approved Standard, Third Edition. CLSI, Wayne, Pennsylvania, M31-A2, **28** (8) (www.clsi.org/source/orders/free/m31-a3.pdf ultimo accesso 8 Giugno 2011).
5. Corradini L., Salami P. & Zavanella M. 1979. Detection of *Salmonella* carriers among the dogs of the province of Ferrara. Isolations in 1 year and antibiotic resistance. *Annali Sclavo*, **21**, 303-306.
6. European Council (EC) 2002. Regulation (EC) 1774/2002 of the European Parliament and of the Council of 3 October 2002 laying down health rules concerning animal by-products not intended for human consumption. *Off J*, **L 273**, 1-95 (eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2002:273:0001:0095:en:pdf ultimo accesso 20 Dicembre 2010).
7. Finley R., Ribble C., Aramini J., Vandermeer M., Popa M., Litman M. & Reid-Smith R. 2007. The risk of salmonellae shedding by dogs fed *Salmonella*-contaminated commercial raw food diets. *Can Vet J*, **48**, 69-75.
8. Galton M.M. 1969. Humans and pets as sources of salmonellae. *J Am Oil Chem Soc*, **46**, 230-232.
9. Grimont P.A.D. & Weill F.-X. 2007. Antigenic formulae of *Salmonella* serovars, 9th Ed. WHO Collaborating Centre for Reference Research on *Salmonella*, Institut Pasteur, Paris, 166 pp (www.pasteur.fr/sante/clre/cadrecnr/salmoms/WKLM_En.pdf ultimo accesso 19 Dicembre 2010).
10. International Organization for Standardization (ISO) 2002. ISO 6579:2002 Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp. ISO, Geneva, 27 pp.
11. International Organization for Standardization (ISO) 2007. ISO 6579:2002/Amd 1 2007 Annex D: Detection of *Salmonella* spp. in animal faeces and in environmental samples from the primary production stage. ISO, Geneva, 9 pp.
12. Joffe D.J. & Schlesinger D.P. 2002. Preliminary assessment of the risk of *Salmonella* infection in dogs fed raw chicken diets. *Can Vet J*, **43**, 441-442.
13. Mantel N. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Res*, **27**, 209-220.
14. Marks S.L. & Kather E.J. 2003. Bacterial-associated diarrhea in the dog: a critical appraisal. *Vet Clin North Am Small Anim Prac*, **33**, 1029-1060.
15. Morse E.V., Duncan M.A., Estep D.A., Riggs W.A. & Blackburn B.O. 1976. Canine salmonellosis: a review and report of dog to child transmission of *Salmonella enteritidis*. *Am J Public Health*, **66**, 82-84.

16. R Foundation for Statistical Computing 2010. R: a language and environment for statistical computing, Reference Index, The R Development Core Team, Version 2.12.1 (2010-12-16). The R Foundation for Statistical Computing, Vienna, 3 117 pp (cran.r-project.org/doc/manuals/fullrefman.pdf and www.R-project.org ultimo accesso 4 Dicembre 2010).
17. Ribot E.M., Fair M.A., Gautom R., Cameron D.N., Hunter S.B., Swaminathan B. & Barrett T.J. 2006. Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. *Foodborne Pathog Dis*, **3** (1), 59-67 (www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/fpd.2006.3.59?journalCode=fpd ultimo accesso 20 Dicembre 2010).
18. Schotte U., Borchers D., Wulff C. & Geue L. 2007. *Salmonella* Montevideo outbreak in military kennel dogs caused by contaminated commercial feed, which was only recognized through monitoring. *Vet Microbiol*, **119**, 316-323.
19. White D.G., Datta A., McDermott P., Friedman S., Qaiyumi S., Ayers S., English L., McDermott S., Wagner D.D. & Zhao S. 2003. Antimicrobial susceptibility and genetic relatedness of *Salmonella* serovars isolated from animal-derived dog treats in the USA. *J Antimicrob Chemother*, **52**, 860-863.
20. Wigley P. 2004. Genetic resistance to *Salmonella* infection in domestic animals. *Res Vet Sci*, **76**, 165-169.
21. World Organisation for Animal Health (Office International des Épizooties: OIE) 2009. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. OIE, Paris (www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_summry.htm ultimo accesso 20 Dicembre 2010).