

ISOLAMENTO DI SALMONELLA ENTERICA DA SUINI MACELLATI MEDIANTE METODICA ISO 6579 E BacTrac 4300 – IMPEDANCE SYSTEM

DETECTION OF SALMONELLA ENTERICA IN PIGS AT SLAUGHTER BY THE ISO 6579 METHOD AND THE BacTrac 4300 – IMPEDANCE SYSTEM

Bonardi S., Paris A., Bassi L., Salmi F., Bacci C., Boni E., Brindani F.
Sezione di Ispezione degli Alimenti di origine animale, Dipartimento di Salute Animale,
Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Parma

SUMMARY

Both the ISO 6579:2002 method and the BacTrac 4300 - Impedance system were applied for the detection of *Salmonella enterica* from pigs at slaughter. A total of 68 pigs, reared in 62 different farms of Northern Italy, were randomly selected during 9 consecutive visits at two slaughter-houses. A total of 204 samples (68 tonsils, 68 samples of caecal matter and 68 ham area carcass swabs) were collected. *S. enterica* was isolated from 8 (11.8%) tonsils, 17 faecal samples (25.0%) and from 10 (14.7%) carcass swabs. The ISO method detected as positive 6 (75.0%) tonsils, 14 (82.4%) faecal samples and 9 (90.0%) carcasses. *S. enterica* was isolated from 8 (100%) tonsils, 14 (82.4%) faecal samples and 10 (100%) carcass swabs by the BacTrac 4300 - Impedance system. *Salmonella* strains serotyping and phagetyping identified 15 *S. Derby*, 5 *S. Agona*, 4 *S. Rissen*, 2 *S. Typhimurium* phage-type U302, 2 *S. Typhimurium* DT120, 2 *S. enterica* 1, 4, [5], 12:i-, 2 *S. Kapemba*, 1 *S. Give*, 1 *S. Anatum* and 1 *S. enterica* non-typeable (R strain).

Key words

Salmonella enterica, pig, slaughter, ISO 6579, BacTrac 4300 - Impedance system

INTRODUZIONE

La salmonellosi è una delle principali malattie di origine alimentare a diffusione mondiale. *Salmonella* risulta largamente presente nella popolazione animale, ma può essere facilmente rinvenuta anche da tamponi ambientali e soprattutto da campioni alimentari. Lo studio epidemiologico del microrganismo si presenta oltremodo complesso, dato il gran numero di animali serbatoio e di fonti di infezione per l'uomo, e pertanto le indagini vanno eseguite impiegando metodologie diagnostiche altamente sensibili e specifiche. In quest'ottica, nel corso di uno studio mirato alla ricerca di *Salmonella* in suini macellati, si è voluto confrontare la metodica di riferimento ISO 6579:2002 con il sistema BacTrac 4300. Questo metodo, basato sulla variazione dell'impedenza elettrica dei brodi selettivi colturali, rileva in tempo reale la produzione di metaboliti batterici,

che ricalca la curva di crescita microbica. La metodica permette di discriminare in tempi rapidi la presenza/assenza di *Salmonella* in campioni alimentari e di origine biologica attraverso un saggio automatizzato, eseguito entro 24 ore dal pre-arricchimento.

MATERIALI E METODI

Nel periodo compreso tra Febbraio 2008 e Giugno 2008, 204 campioni di origine suina sono stati sottoposti alla ricerca di *Salmonella enterica* mediante l'applicazione di due diverse metodiche analitiche, al fine di confrontarne l'accuratezza. I campioni, prelevati da 68 suini pesanti macellati in due stabilimenti industriali della provincia di Mantova, erano rappresentati da 68 amigdale, 68 tamponi della carcassa e 68 campioni di materiale cecale. I campioni, raccolti durante nove visite successive presso gli im-

pianti di macellazione, sono stati prelevati da animali provenienti da 62 allevamenti ubicati in 14 province delle regioni Lombardia, Emilia-Romagna, Veneto e Piemonte. Le amigdale ed il contenuto dell'intestino cieco, prelevati utilizzando bisturi sterili monouso, sono stati trasferiti in contenitori sterili dal tappo a vite. Il campionamento delle carcasse è stato eseguito utilizzando Sponge-bag, idratate con 10 ml di Buffered Peptone Water (BPW) prima dell'uso, strofinate sulla faccia mediale della coscia (area di 100 cm²). I campioni, conservati a temperatura di refrigerazione, sono stati trasportati al laboratorio e sottoposti, entro 4 ore dal prelievo, alla ricerca di *Salmonella*. Le analisi sono state eseguite sia applicando la norma di riferimento ISO 6579:2002, sia la procedura BacTrac 4300 (SY-LAB, Neupurkersdorf, Austria), che sfrutta il principio dell'impedenza legata allo sviluppo di una specifica coltura batterica. Il metodo è in grado di rilevare la presenza di 1 UFC di *Salmonella* in 10 g di campione, applicando protocolli specifici a seconda della natura della matrice.

– Rilevazione di *Salmonella* da campioni di amigdale e tamponi superficiali eseguiti sulle carcasse (metodica V1.20.1, SY-LAB): si è applicata la procedura normalmente impiegata per la ricerca di *Salmonella* in carne cruda bovina e suina. La procedura prevede il pre-arricchimento del campione in brodo colturale non selettivo (BPW), con diluizione 1:10, in sacchetti sterili da Stomacher. Dopo incubazione a 37°C per 6-8 ore, 0,1 ml del campione pre-arricchito vengono trasferiti in appositi flaconi muniti di elettrodi contenenti 9,9 ml dei brodi selettivi specifici previsti dalla metodica BacTrac 4300 (BiMedia 201C e BiMedia 205A, rispettivamente Rappaport-Vassiliadis Soya Broth e Selenito-Cistina Broth). I flaconi sono poi caricati sull'apparecchio BacTrac, che svolge tutte le operazioni di rilevamento in modo completamente automatizzato, senza la necessità di eseguire una calibrazione preventiva. Il campione viene incubato per 21,5 ore a 40°C (BiMedia 201C) e a 37°C (BiMedia 205A) ed ad intervalli di 10 mi-

nuti lo strumento rileva la variazione dei valori M e E. La tecnologia BacTrac dispone infatti di un duplice sistema di rilevazione della variazione di impedenza, basato sia sulla registrazione dell'evoluzione dell'impedenza nel brodo colturale (valore M), sia sul duplice strato elettrochimico presente sulla superficie degli elettrodi (valore E) di cui sono dotati i contenitori.

- Rilevazione di *Salmonella* da campioni di feci (metodica V9.20.1, SY-LAB): si è applicato il protocollo in uso per l'isolamento di *Salmonella* da escrementi e lettiera di pollame. Il campione viene incubato in brodo selettivo (Selenito-Cistina) a 37°C per 18 ore \pm 2. In seguito 0,1 ml vengono trasferiti in un flacone contenente 9,9 ml di BiMedia 201C. Il brodo di arricchimento viene posto ad incubare nello strumento BacTrac a 40°C per 24 ore. Per le caratteristiche di questa tipologia di campione il sistema valuta solo il parametro E.

I valori M ed E rispecchiano la crescita di *Salmonella* nel brodo colturale, dato che lo sviluppo del batterio comporta un aumento nel numero di ioni presenti nel terreno, modificando il comportamento elettrico di questo nel tempo (impedenza). I valori M ed E dunque ricalcano la tipica curva di crescita batterica. Il valore soglia per definire la presenza di *Salmonella* è impostato sulla prima fase di crescita esponenziale della curva: rispettivamente 3% e 10% per il BiMedia 201C, e 10% per il BiMedia 205A. Il valore soglia è influenzato dal grado di contaminazione da *Salmonella* del campione, fornendo informazioni anche quantitative oltre che qualitative, essendo proporzionale al tempo necessario per il raggiungimento del valore soglia. I campioni che mostrano una curva con lieve aumento o che non sorpassa il valore soglia, sono da considerarsi negativi e non necessitano di ulteriori indagini. I campioni la cui curva è indicativa dello sviluppo di *Salmonella* sono da considerarsi positivi, ma devono essere sottoposti a prove di conferma, quali la semina su terreni selettivo-differenziali e l'identificazione biochimico-serologica delle colonie eventualmente cresciute.

Tabella 1: risultati della ricerca di *Salmonella* in campioni di origine suina mediante metodica ISO 6579:2002 e sistema BacTrac 4300.

Tipologia del campione	N° campioni	N° di campioni positivi	N° (%) di campioni positivi (ISO 6579:2002)	N° (%) di campioni positivi (BacTrac 4300)
Amigdale	68	8	6 (75.0%)	8 (100%)
Feci	68	17	14 (82.4%)	14 (82.4 %)
Tamponi superficiali carcasse	68	10	9 (90.0%)	10 (100%)

RISULTATI

L'associazione delle due metodiche, ISO 6579:2002 e BacTrac 4300, ha portato all'isolamento di *S. enterica* da 35 campioni (17,2%) su 204. Nello specifico sono risultati contaminati da *Salmonella* 8 (11,8%) amigdale, 17 (25,0%) campioni di materiale fecale e 10 (14,7%) tamponi effettuati sulle carcasse (Tabella 1). I sierotipi isolati sono elencati nella Tabella 2.

La metodica ISO 6579:2002 ha permesso l'isolamento di *S. enterica* da 14 (82,4%) campioni di feci su 17, da 6 (75,0%) amigdale su 8 e da 9 (90,0%) carcasse su 10. Il sistema BacTrac 4300 ha identificato come contaminati da *Salmonella* 14 (82,4%) campioni di materiale intestinale su 17, 8 (100%) amigdale su 8 e 10 (100%) carcasse su 10.

La fagotipizzazione, eseguita sui 4 stipiti di *S. Typhimurium*, ha identificato *S. Typhimurium* fagotipo U302 in un'amigdala e nel tampone della carcassa corrispondente e *S. Typhimurium* DT120 in altri due campioni di tessuto tonsillare.

CONSIDERAZIONI E CONCLUSIONI

Nel presente studio, *S. Derby* si conferma la sierovariante di *S. enterica* maggiormente isolata dal suino, contrariamente ai dati nazionali che identificano in *S. Typhimurium* il sierotipo di più frequente riscontro in campioni di origine suina (1). Anche in-

dagini recenti eseguite in altri paesi identificano in *S. Derby* e *S. Typhimurium* i sierovar isolati con maggiore frequenza da suini macellati (2).

Appare inoltre interessante l'isolamento di *S. Rissen* (spesso associata a campioni derivati dal suino) e soprattutto di *S. enterica* di gruppo "B" 1,4,[5],12:i:-; quest'ultima sierovariante è isolata di frequente dal suino e si dimostra spesso responsabile di focolai di salmonellosi umana (3). Anche l'identificazione di *S. Kapemba*, sierotipo appartenente al gruppo D (formula antigenica 9,12:1,v:1,7), riveste notevole interesse dal punto di vista epidemiologico, dato che il suo isolamento rappresenta un evento piuttosto raro, nonostante la sua diffusione a livello mondiale. Generalmente *S. Kapemba* provoca gastroenterite nell'uomo, ma talvolta può causare un'infezione febbrile acuta e sistemica riconducibile alla febbre tifoide. I sintomi classici sono rappresentati da elevata ipertermia (40,2°C), anoressia, perdita di peso, forti dolori addominali, bradicardia, leucopenia (o pancitopenia), ittero, colecistite e altre gravi complicanze quali CID, encefalomeningite, perforazione intestinale, osteomielite, nefrite e infezioni ad organi parenchimatosi (4).

L'elevata frequenza di isolamento di *S. Agona* dalle carcasse suine, rispetto ad altri sierotipi, è attribuibile ad un massiccio episodio di cross-contaminazione che si è verificato nel corso di una sola giornata all'interno di uno dei due stabilimenti di macellazione (episodio che ha determinato l'isolamento del microrganismo da tutte le carcasse cam-

Tabella 2: sierotipi di *S. enterica* isolati da suini macellati

sierotipi	N° (%) di sierotipi isolati			
	Feci	Amigdale	Carcasse	Totale
<i>S. Derby</i>	8 (47,1%)	5 (62,5%)	2 (20,0%)	15 (42,8%)
<i>S. Agona</i>			5 (50,0%)	5 (14,3%)
<i>S. Typhimurium</i>		3 (37,5%)	1 (10,0%)	4 (11,4%)
<i>S. Rissen</i>	3 (17,6%)		1 (10,0%)	4 (11,4%)
<i>S. enterica</i> 1,4, [5], 12:i:-	2 (11,8%)			2 (5,7%)
<i>S. Kapemba</i>	1 (5,9%)		1 (10,0%)	2 (5,7%)
<i>S. Give</i>	1 (5,9%)			1 (2,9%)
<i>S. Anatum</i>	1 (5,9%)			1 (2,9%)
<i>S. enterica</i> in fase R non tipizzabile	1 (5,9%)			1 (2,9%)
<i>totale</i>	17	8	10	35

pionate in tale sessione, a distanza di ore l'una dall'altra).

L'applicazione di due metodiche analitiche finalizzate all'isolamento di *Salmonella* da campioni di origine suina ha permesso di raccogliere dati interessanti sia dal punto di vista epidemiologico, che analitico.

Per quanto riguarda la ricerca di *Salmonella* da materiale fecale, l'abbinamento dei due metodi ha individuato un numero superiore di suini portatori intestinali del microrganismo, rispetto all'applicazione della sola metodica ISO. Infatti, presi singolarmente, hanno presentato uguale sensibilità, identificando ciascuno 14 campioni positivi, di cui 11 corrispondenti e 3 positivi ad una ciascuna delle due metodiche, per un totale di 17 campioni contaminati da *Salmonella*.

Tuttavia il sistema BacTrac 4300 ha mostrato una sensibilità superiore al metodo ISO per i campioni di tessuto tonsillare e i tamponi eseguiti sulle carcasse, pur non essendovi un protocollo appositamente studiato per tali matrici. Inoltre, per i campioni negativi, il risultato viene fornito nell'arco di sole 48 ore.

Grazie ai risultati ottenuti, il metodo BacTrac 4300, validato in Germania DIN 10120 e annoverato tra i metodi ufficiali tedeschi per la ricerca di *Salmonella* da prodotti alimentari, potrebbe affiancare il metodo di riferimento ISO 6579 nei piani nazionali di monitoraggio finalizzati al controllo dell'infezione da *Salmonella* nei suini macellati (eseguito sui linfonodi ileo-cecali). Inoltre potrebbe essere impiegato nei piani di autocontrollo per valutare la contaminazione delle carcasse suine, secondo quanto stabilito dai Regolamenti CE 2073/2005 e 1441/2007.

Ringraziamenti: Si ringrazia la Dott.ssa Gisella Pizzin per la fattiva e determinante collaborazione.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Enter-Vet, 2006 – Rapporto annuale. Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Centro di referenza nazionale per la salmonellosi.
- 2) Mainar-Jaime, R.C., Atashparvar, N., Chinino-Trejo, M., Rahn, K. (2008). Survey on *Salmonella* prevalence in slaughter pigs from Saskatchewan. *Canadian Veterinary Journal*, 49, 793-796.
- 3) Mossong J., Marques P., Ragimbeau C., Huberty-Krau P., Losch S., Meyer G., Moris G., Strottner C., Rabsch W., Schneider F. (2007). Outbreaks of monophasic *Salmonella enterica* serovar 1,4, [5], 12:i:- in Luxembourg, 2006. *Eurosurveillance*, 12 (6), 11-12.
- 4) Sarnighausen H.-E., Benz C., Eickenberg M., Bockemühl J., Tschäpe H., Riemann J.F. (1999). Typhoid fever due to *Salmonella* Kapemba infection in an otherwise healthy middle-aged man. *Journal of Clinical Microbiology* 37 (7), 2381-2382.