

Approfondimento specialistico
Rischio per la salute in allevamento suini

Presenza di Salmonella spp. ed Escherichia coli Extended- Spectrum Beta-Lactamases (ESBL) in un macello suino

M.G. Orlando¹, C. Bacci²,

¹Tecnico della Prevenzione nell'Ambiente e nei Luoghi di Lavoro

²Università di Parma- Dipartimento di Scienze Medico-Veterinarie

mail: m.giovannaorlando@gmail.com

Riassunto

Introduzione: *Escherichia coli* e *Salmonella* sono tra i principali agenti di zoonosi, infezioni o malattie che possono essere trasmesse direttamente o indirettamente tra gli animali e l'uomo. Trattandosi di microrganismi ubiquitari e privi di particolari esigenze di crescita, si trasmettono prevalentemente attraverso la via oro-fecale, ad esempio mediante l'ingestione di alimenti contaminati. Negli ultimi anni, le infezioni causate da batteri antibiotico-resistenti risultano essere un serio problema per la salute pubblica, infatti, ogni anno nell'UE i batteri antibiotico-resistenti causano circa 25000 decessi.¹

A tal proposito, diverse ricerche hanno mostrato che batteri appartenenti alla famiglia delle *Enterobacteriaceae*, come ad esempio *E. coli*, sono in grado di trasferire geni codificanti enzimi capaci di indurre resistenza ad alcune classi di antibiotici.²

Metodi: Nel periodo tra agosto ed ottobre 2016 sono stati raccolti 60 campioni (30 di feci e 30 da carcassa) da suini allevati e macellati nella provincia di Reggio Emilia ed analizzati presso il laboratorio di Microbiologia degli alimenti dell'U.O. di Ispezione degli alimenti di O.A. (Dipartimento di Scienze Medico-Veterinarie, Parma). L'isolamento di *Salmonella* spp. è stato eseguito seguendo le indicazioni della norma ISO 6579:2008, mentre per l'isolamento di *Escherichia coli* ci si è riferiti a quanto previsto dalla norma ISO 16649-2:2001.

Risultati: Da un solo campione fecale è stato possibile isolare *Salmonella* spp., mentre *Escherichia coli* è stato riscontrato nella totalità dei campioni analizzati. I ceppi di *Escherichia coli* isolati sono stati testati mediante tecnica dell'agar-diffusione con dischetto per la ricerca di resistenze alle cefalosporine di III e IV generazione (ovvero produttori di ESBL). Dieci ceppi isolati su 30 hanno mostrato resistenza nei confronti delle molecole antibiotiche cefotaxime e ceftazidime. Dai campioni ottenuti dalle carcasse suine, sono state isolate quattro *Salmonella* spp., mentre *Escherichia coli* ESBL sono risultati presenti in 10 campioni testati.

Discussioni: I risultati evidenziano che la diffusione di ceppi di *Escherichia coli* resistenti alle cefalosporine di III e IV generazione è un fenomeno importante. La presenza del patogeno *Salmonella* spp. sulle carcasse mette in risalto l'importante ruolo dell'adozione di buone pratiche di gestione del sistema di autocontrollo, in sede di macellazione.

Abstract

Introduction: *Escherichia coli* and *Salmonella* are among the principal agents of zoonosis, infections or illnesses that can be transmitted directly or indirectly between the animals and the man. Treating itself of microorganisms ubiquitous and deprived of particular demands of growth, they primarily transmit him through the street gold-fecale, for instance through the ingestion of contaminated foods. In the last years, the infections caused by antibiotic-resistant bacterias result to be a serious problem for the public health, in fact, every year in the UE the antibiotic-resistant bacterias cause around 25000 deaths. 3. To such intention, different searches have shown that belonging bacterias to the family of the Enterobacteriaceaes, as for instance *E. coli*, are able to transfer geniuses codifying enzymes able to induce resistance to some classes of antibiotic.¹

Methods: In the period among August and October 2016 they have been picked 60 champions (30 of faeces and 30 from carcass) from raised swines and butchered in the province of Reggio Emilia and analyzed to the laboratory of Microbiology of the foods of the U.O. of Inspection of the foods of O.A. (Department of Physician-veterinary Sciences, Parma). The isolation of *Salmonella* spp. has been performed following the indications of the norm ISO 6579:2008, while for the isolation of *Escherichia coli* has referred to how much anticipated from the norm ISO 16649 -2:2001.

Results: From an only champion fecale has been possible to isolate *Salmonella* spp., while *Escherichia coli* has been found in the totality of the analyzed champions. The fetterses of *Escherichia coli* isolated they have been made a will through technique of the agar-diffusion with diskette for the search of resistances to the cefalosporines of III and IV generation (or manufacturing of ESBL). Ten isolated fetterses on 30 have shown resistance towards the antibiotic molecules cefotaxime and ceftazidime. From the champions gotten by the pig carcasses, I am isolated sati four *Salmonella* spp., while *Escherichia coli* ESBL they are present results in 10 made a will champions.

Discussions: The results underline that the diffusion of fetterses of *Escherichia coli* resistant to the cefalosporines of III and IV generation is an important phenomenon. The presence of the patogeno *Salmonella* spp. on the carcasses it puts in prominence the important role of the adoption of good practices of management of the system of self-control, at the place of slaughter.

Take on message

- *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. sono stati classificati come i principali responsabili della resistenza mediata da ESBL, rinvenuti in tutti i principali animali produttori di alimenti, più spesso in polli, suini, bovini.
- *Escherichia coli* produttori di β -lattamasi a spettro esteso (ESBL) rappresentano un problema di notevole rilievo clinico ed epidemiologico; ogni anno vengono registrati milioni di casi di infezione che non riguardano soltanto gli Stati membri dell'Unione Europea.
- Il Tecnico della prevenzione come autorità competente deve assicurarsi che le azioni impiegate dagli OSA siano conformi alle normative nazionali e comunitaria

Introduzione

Le zoonosi sono definite come infezioni o malattie trasmesse direttamente o indirettamente tra gli animali e l'uomo e sostenute da microrganismi diversi (batteri, virus, parassiti). A seguito del contagio, che avviene comunemente per via oro-fecale anche mediante l'ingestione di alimenti contaminati, possono comparire forme cliniche, che variano a seconda dell'agente patogeno, con possibile insorgenza di gravi complicazioni, riscontrate soprattutto in soggetti a rischio (soggetti immunodepressi, bambini, anziani, donne in gravidanza ecc.). (Ricci, 2015).

Nel ciclo epidemiologico dei microrganismi, causanti zoonosi, gli animali portatori rappresentano un importante serbatoio di mantenimento e diffusione. In allevamento gli animali contraggono un'infezione attraverso il consumo di alimenti o per contatto con l'ambiente contaminato. Ad incentivare un aumento di carica batterica si aggiungono fattori esterni come il clima, il management aziendale e il mancato rispetto del benessere animale. E' anche possibile che avvenga una trasmissione di microrganismi delle carcasse in fase di macellazione, in particolare durante le fasi di eviscerazione e pulizia, a causa del contatto accidentale con il contenuto intestinale o, nelle fasi successive di lavorazione per impiego di utensili non idoneamente igienizzati o separati o a causa di personale portatore (EFSA, 2012).

Escherichia coli* e *Salmonella sono tra i principali agenti di zoonosi, trattandosi di microrganismi ubiquitari e privi di particolari esigenze di crescita.

- *Escherichia coli* è un microrganismo commensale dell'uomo e degli animali, che fa parte della normale flora intestinale ed è solitamente innocuo (Doyle M. P., 2012), ma è stato osservato che i ceppi di *Escherichia coli* enteroemorragico (EHEC) rappresentano una seria minaccia per la salute umana, in quanto sono in grado di produrre delle tossine, causando la diarrea emorragica e la sindrome emolitico-uremica (SEU), da cui può derivarne anche la morte (EFSA, 2011).
- *Salmonella* è considerato un importante agente patogeno, responsabile di infezioni sia nell'uomo che negli animali (Rosati, 2012), a causa della sua ubiquità e capacità di crescita ad una temperatura compresa tra i 6 –

46 °C. Tra le varie manifestazioni cliniche emerge la salmonellosi umana che è generalmente caratterizzata da febbre, dolori addominali, diarrea e nausea accompagnata talvolta da vomito

La resistenza agli antibiotici (sia in ambito medico che veterinario), definita come la capacità di un microorganismo di resistere all'azione di un antibiotico e quindi di moltiplicarsi anche in sua presenza, dal punto di vista biologico è un fenomeno naturale ed evolutivo che segue la selezione naturale⁴ che risulta essere un serio problema per la salute pubblica, tantoché, ogni anno nell'UE si registrano circa 25000 decessi⁵

I meccanismi di resistenza agli antibiotici, generati dai microrganismi, sono dovuti a mancato raggiungimento al sito bersaglio, alterazione del bersaglio e inattivazione del farmaco. Su quest'ultimo giocano un ruolo importante le β -lattamasi a spettro esteso (ESBL), ovvero enzimi che conferiscono resistenza alle penicilline, a tutte le cefalosporine, in particolare a quelle di III e IV generazione e ad aztreonam, ma non ai carbapenemi e alle cefamicine.⁶ Questi enzimi prodotti da batteri appartenenti alla famiglia delle *Enterobacteriaceae*, come ad esempio *E. coli*⁷. A tal proposito, diversi studi condotti nell'UE hanno rilevato la diffusione di *E. coli* produttori di β -lattamasi a spettro esteso (ESBL) che danno resistenza verso cefalosporine di III e IV generazione, in associazione ad altre resistenze, come fluorochinoloni, colistina e tetracicline.

Obiettivo:

- Il presente lavoro è finalizzato a valutare la presenza di *Salmonella* spp. ed *Escherichia coli* ESBL in campioni di feci e da carcasse, prelevati in sede di macellazione da suini allevanti in condizioni intensive.

Materiali e metodi

Nel periodo tra Agosto ed Ottobre 2016 sono stati prelevati 30 campioni di feci da allevamenti intensivi di suini della provincia di Reggio Emilia e 30 campioni da carcassa suina in un macello sito nella stessa area. L'attività di campionamento è stata condotta durante il periodo di tirocinio, svolto presso il Servizio Veterinario dell'Azienda USL di Reggio Emilia, Dipartimento di Sanità Pubblica ed il laboratorio di Microbiologia dell'U.O. di Ispezione degli Alimenti di origine animale del Dipartimento di Scienze Medico-Veterinarie.

I 30 campioni di feci sono stati raccolti in contenitori sterili dal tappo a vite, per un totale di 3 g, e sono stati mantenuti, sin dal momento del prelievo in azienda fino alla consegna al laboratorio, a temperatura di refrigerazione.

Le carcasse (n. 30) sono state campionate secondo quanto previsto dal Reg. CE 2073 del 2005 e s.m.i., Allegato I Cap. 3, che identifica la norma ISO 17604:2015 come riferimento per il metodo di campionamento (non distruttivo), la scelta dei siti di prelievo, le regole per la loro conservazione e il trasporto.

I campioni sono stati raccolti tramite l'utilizzo di spugne abrasive imbevute con 10 ml di soluzione sterile e contenute in appositi sacchetti (SaniSponge, VWR Chemicals, Italia). Al termine del prelievo la spugnetta è stata riposta nel proprio sacchetto ed è stato aggiunto il terreno di pre-arricchimento specifico (Buffered Peptone Water BPW, Biolife Italiana, Italia), fino a un volume totale di 25 ml. Il sacchetto è stato chiuso ermeticamente, identificato e inviato immediatamente al laboratorio a una temperatura di trasporto di +8 °C +/- 2°C.

1. Per la ricerca di *Salmonella* spp. è stata applicata la procedura prevista dalla norma UNI ISO 6579:2002 sia per i campioni di feci sia per i campioni raccolti dalle carcasse. Tale norma prevede:
 - Fase di pre-arricchimento,
 - Fase di arricchimento,
 - Semina in piastra su terreno selettivo
 - Valutazione delle prove biochimiche e conferma sierologica
 - Allestimento micro gallerie



Figura n. 1: Identificazione di *Salmonella* spp. con metodo API 20E®

2. Per la ricerca di *Escherichia coli* è stata applicata, in parte, la procedura prevista dalla norma UNI ISO 16649-2:2001 sia per i campioni di feci sia per i campioni raccolti dalle carcasse. La ISO 16640-2 definisce le fasi per la numerazione degli *Escherichia coli* β -glucuronidasi positivi nei campioni in esame; nel nostro caso non sono state seguite le fasi di diluzione in provetta e in piastra, poiché non abbiamo eseguito una conta batterica. Pertanto vengono di seguito riportate le varie fasi di procedimento:
 - Fase di pre-arricchimento
 - Semina in piastra con terreno selettivo
 - Valutazione delle colonie e prove biochimiche di conferma
 - Allestimento microgallerie biochimiche
3. Le colonie identificate come *Escherichia coli* sono state sottoposte alla ricerca di resistenze antibiotiche verso cefalosporine di III e IV generazione. Il metodo che ho utilizzato, previsto dalla Commissione Europea per i test di sensibilità antibiotica (EUCAST), è l'agar diffusione con dischetto o test di Kirby Bauer.

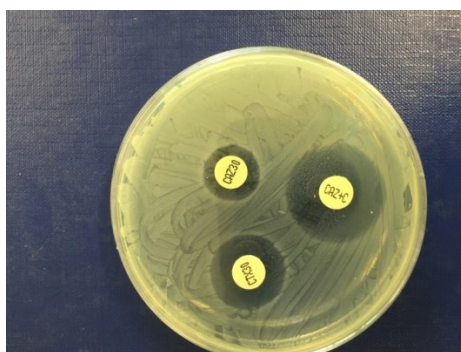


Figura n. 2: Aloni di inibizione di ceppi di *Escherichia coli* nei confronti di Cefotaxime, Ceftazidime, Cefepime (resistente).

Risultati

I risultati ottenuti dai campioni di materiale fecale analizzato (n.30) sono riportati in Tabella 1.

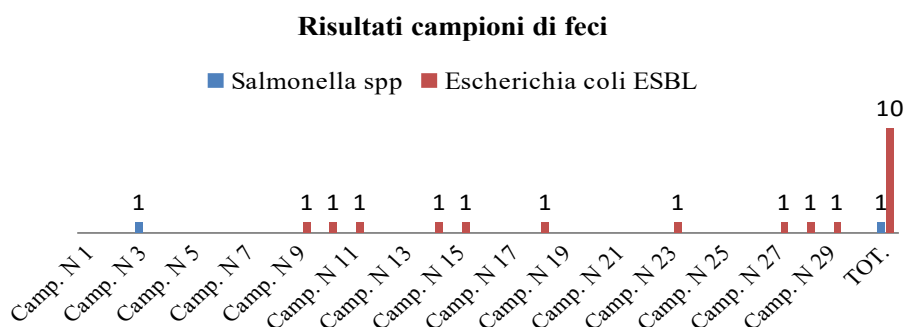


Tabella 1: Presenza di *Salmonella* spp. e di *Escherichia coli* produttori di β -lattamasi a spettro esteso (ESBL) in campioni di feci di suino.

Gli antibiogrammi eseguiti sulle colonie isolate di *Escherichia coli* hanno evidenziato la presenza di 10 ceppi sui 30 testati di possibili produttori di β -lattamasi a spettro esteso (33,3%). I risultati delle resistenze presentate dagli *Escherichia coli* ESBL isolati sono riportati nella Tabella 2.

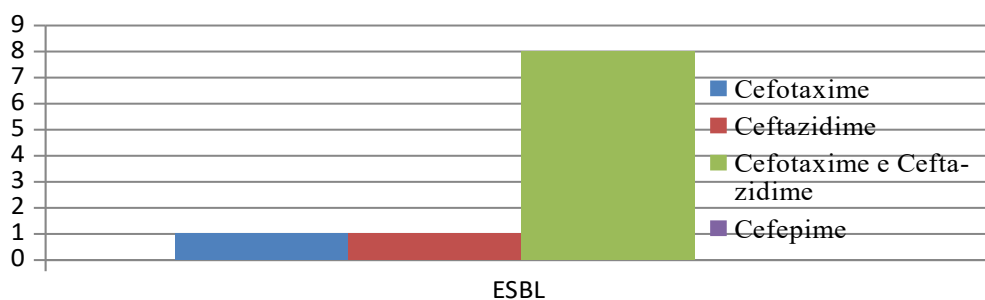


Tabella 2: *Escherichia coli* ESBL, resistenze rilevate sui ceppi isolati da carcassa suina.

I risultati ottenuti dal campionamento effettuato sulle carcasse al macello (n.30 campioni), sono riportati nella Tabella 3

Risultati campioni da carcassa

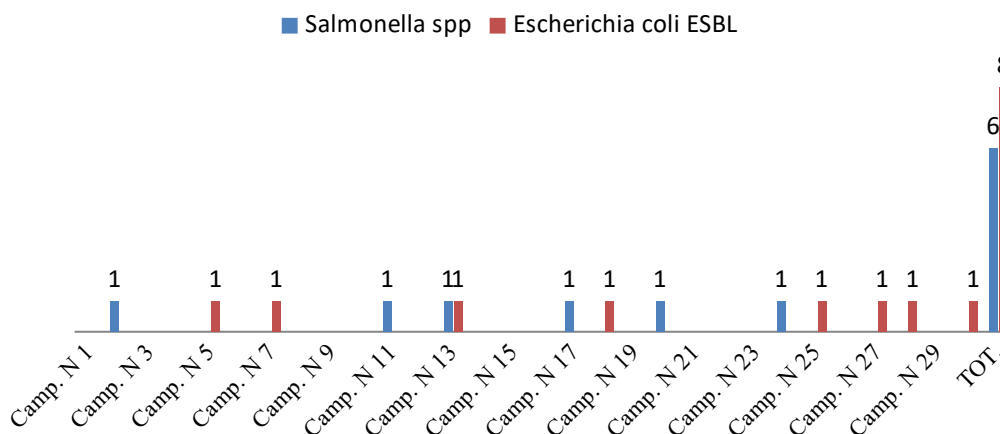


Tabella 3: Presenza di *Salmonella* spp. ed *Escherichia coli* produttori di β-lattamasi a spettro esteso (ESBL) in campioni ottenuti da carcasse.

La Tabella 4 mostra i risultati delle singole resistenze presentate dagli *Escherichia coli* produttori di β-lattamasi aspetto esteso rilevati

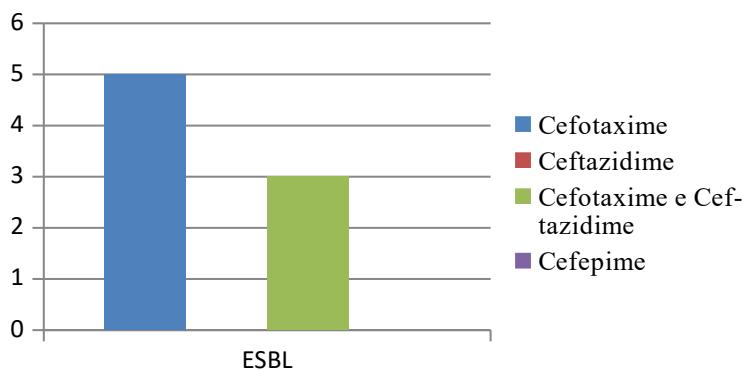


Tabella 4: *Escherichia coli* ESBL, resistenze rilevate sui ceppi isolati da carcassa suina.

Discussioni

L'ubiquità e la capacità di sopravvivere nell'ambiente esterno sono caratteristiche che conferiscono al batterio *Salmonella* la possibilità di poter causare infezioni sia nell'animale che nell'uomo e viene definito come un importante agente patogeno garante di molteplici manifestazioni cliniche, di cui, tra tutte, la salmonellosi è quella che oggi rappresenta una delle malattie più diffuse in tutto il mondo. Il documento redatto dall'EFSA, in concomitanza con l'ECDC, sulla valutazione da agenti di zoonosi trasmessi per via alimentare, specifica che circa il 5,3% di Salmonellosi vengono contratte proprio a seguito dell'ingestione di alimenti a base di carne suina, soprattutto cruda (EFSA, 2013)

Escherichia coli, che fa parte della normale flora intestinale, è generalmente un opportunisto, ma in presenza di alcune condizioni rappresenta un possibile importante agente di forme cliniche nell'animale e nell'uomo. Proprio su quest'ultimo agisce causando una forma di diarrea emorragica e la sindrome emolitico-uremica (SEU), che può esitare nella morte del paziente⁸

L'antibiotico-resistenza è un problema presente in medicina umana e veterinaria, e aggravato sia dall'uso di antimicrobici in modo inadeguato che dalla scarsa propensione alla ricerca e allo sviluppo di nuove molecole. In passato tale problematica è stata sottovalutata, ma negli ultimi decenni è emersa in tutta la sua portata come fenomeno diffuso in tutto il mondo e esteso a varie classi di antibiotici, anche a quelli considerati da ultima risorsa, provocando annualmente milioni di decessi⁹. A tal proposito studi europei hanno mostrato che batteri appartenenti alla famiglia delle Enterobacteriaceae, sono in grado di trasferire geni codificanti enzimi capaci di indurre resistenza ad alcune classi di antibiotici. Peculiarità che è stata riscontrata in *E. coli* produttori di β -lattamasi a spettro esteso (ESBL) resistenti nei confronti di cefalosporine di III e IV generazione. (European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), 2014)

Conclusioni

I dati ottenuti nel presente studio in merito alla presenza di *Salmonella* nelle feci di suini macellati definisce il rischio derivato dalla possibile contaminazione fecale, sia delle masse muscolari sia dell'impianto di macellazione, con conseguente pericolo per la salute pubblica.⁸ I campioni di carcassa positivi per *Salmonella* sono di numero maggiore rispetto ai precedenti fecali. Questo risultato può essere legato ad una possibile contaminazione delle strutture del macello. Va, inoltre, considerata che la presenza di *Salmonella* sulle carcasse può indicare una mancata applicazione di misure igienico sanitarie da parte dell'OSA. E pertanto, la conseguenza principale può essere la compromissione dello stato di salute dei cittadini, per consumo di prodotti a base di carne suina contaminata da *Salmonella*. Nonostante un ridotto numero di campioni, è stato possibile constatare una rilevante presenza di *Escherichia coli* ESBL. Questo non fa altro che sottolineare l'importanza di un fenomeno esteso su scala mondiale e di interesse pubblico. Oltretutto statistiche provenienti da studi europei hanno identificato gli animali portatori ed il cibo come fattori di rischio nella trasmissione di ESBL.¹⁰

Il tecnico della prevenzione nell'ambiente e nei luoghi di lavoro (TPALL), in qualità di un operatore sanitario responsabile di tutte le attività di prevenzione, verifica e controllo in materia d'igiene e sicurezza degli alimenti e delle bevande, di igiene e sanità veterinaria, oltre che di sicurezza ambientale nei luoghi di vita e di lavoro, possiede conoscenze normative, igienico-sanitarie ma anche abilità formative e comunicative, e pertanto:

- Eseguire controlli ufficiali sin dalla filiera dei mangimi, effettuare verifiche ispettive, sia in allevamento che in macello, mirate a constatare l'adempimento di corrette misure igieniche, che includono pulizia e sanificazione del locale e corretta gestione delle detenzioni ed una volta che l'alimento viene immesso sul mercato vengono eseguite le attività di ispezione, di verifica e di campionamento volte ad accertarne il livello di sicurezza, conforme al Reg. CE 2073/2005 (stabilisce che ogni operatore del settore alimentare deve garantire il rispetto dei criteri microbiologici relativi ai prodotti alimentari).
- Informa sia gli operatori del settore alimentare sui rischi connessi alla contaminazione delle carni durante le fasi di lavorazione, sia la popolazione su tutte le corrette misure di prevenzione (lavaggio delle mani, da effettuare prima, durante e dopo la manipolazione degli alimenti; pulizia e sanificazione degli utensili e strumenti utilizzati per la preparazione dell'alimento; refrigerazioni in contenitori qualora si scelga di non consumare gli alimenti già preparati, in modo da garantire un rapido abbattimento delle specie microbica), al fine di evitare il fenomeno.

- Non si limita solamente a valutare i rischi associati alla resistenza antimicrobica, ma applica, nel rispetto di norme nazionali e comunitarie, misure di sorveglianza e monitoraggio sia a livello di produzione primaria che in altre fasi della catena alimentare, compresa la produzione di prodotti alimentari e mangimi, volte a fornire indicazioni attendibili sulla presenza e/o assenza e/o sull'entità del fenomeno. Ad esempio, la Decisione 2013/652/UE in vigore dal 1° gennaio 2014, prevede l'esecuzione di campionamenti specifici per il monitoraggio di batteri commensali (*E. coli*) che talvolta possono diventare patogeni, proprio per il loro ruolo determinate nello sviluppo, scambio e diffusione dei determinanti di resistenza ai diversi agenti antimicrobici, soprattutto nell'intestino di specie animali di interesse zootecnico. Il **Piano di Contrasto all'Antimicrobico-Resistenza (PNCAR) 2017-2020, pubblicato in Italia il 27 dicembre del 2017, individua 6 ambiti di intervento** : sorveglianza; prevenzione e controllo delle infezioni; uso corretto degli antibiotici, compresa "antimicrobial stewardship"; formazione; comunicazione e informazione; ricerca e innovazione, e disegna un percorso per l'azione che comprende obiettivi precisi e azioni, per i quali è previsto un processo di monitoraggio e valutazione basato su indicatori quantitativi misurabili. Prevede l'integrazione di tutti i settori interessati: umano, veterinario, di sicurezza degli alimenti, agricolo e ambientale; individua i principali esiti di salute che si vogliono raggiungere attraverso la sua realizzazione; indica le azioni principali da realizzare a livello nazionale e regionale/locale per promuovere un efficace contrasto del fenomeno dell'AMR nella sorveglianza, prevenzione e controllo delle infezioni da microrganismi resistenti e dell'AMR; l'uso appropriato e la sorveglianza del consumo degli antimicrobici; il potenziamento dei servizi diagnostici di microbiologia; la formazione degli operatori sanitari; l'informazione/educazione della popolazione; la ricerca e sviluppo.

-
- Regolamento (CE) n. 2073/2005 della commissione del 15 novembre 2005 sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari e s.m.i. ,
 - Decisione della Commissione del 12 novembre 2013 relativa al monitoraggio e alle relazioni riguardanti la resistenza agli antimicrobici dei batteri zoonotici e commensali
 - Piano di Contrasto all'Antimicrobico-Resistenza (PNCAR) 2017-2020 – www.salute.gov.it

BIBLIOGRAFIA

1. **Doyle M. P. Erickson M.** opportunities for mitigating pathogen contamination during on farm food production [Rivista] // International Journal of food micrology. - 2012.
2. **EFSA** Focaliaio di E.coli produttore di Shiga-tossine [Rivista] // EFSA Journal. - 2011.
3. **EFSA** La resistenza agli antimicrobici è in aumento nell'Unione europea, avvertono l'EFSA e l'ECDC [Rivista] // EFSA Journal. - 2016.
4. **EFSA** The European Union Sommary Report on Treand and Sources of Zoonoses, Zoonotics Agents and Food-borne Outbreaks in 2001 [Rivista] // Efsa Journa 2013; 11(4):3129. - 2013. - p. 250.
5. **EFSA** Zoonosi di origine alimentare [Rivista] // Efsa Journal. - 2012. - p. 4.
6. **European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC)** Antimicrobial resistance Surveillance European 2014 [Rapporto]. - [s.l.] : SURVEILLANCE REPORT, 2014.
7. **G. Zavarella** Escherichia coli, una scoperta continua [Rivista]. - 2009. - p. 76.
8. **Giuseppe Miragliotta, Anna Di Taranto, Rossella De Nittis.** ESBL-producing E.coli and K.pneumoniae: prevalence and antimicrobial susceptibility [Sezione di libro] // Microbiologia Medica, Vol.24 (3). - 2009.
9. **Graziani Caterina [et al.]** Infezioni da Salmonella: diagnosi, epidemiologia e sorveglianza [Rapporto]. - 2005.
10. **Müller A. Stephan R., Nüesch-Inderbinen M.** Distribution of virulence factors in ESBL-producing Escherichia coli isolated from the environment, livestock, food and humans [Rivista] // PubMed. - 2016.
11. **Ricci Antonio** Il controllo delle malattie a trasmissione alimentare e il ruolo della Sanità Pubblica [Atti di convegno] // Convegno Food Safety and Food Security. - Roma : [s.n.], 2015. - p. 2.
12. **Romero S. Zalazar M., Morales M., Rojas M** Presenza di beta-lattamasi ad ampio spettro in enterobatteri isolati di casi di infezione nosocomiale [Rivista] // Ciencia. - 2011.
13. **Rosati R.** Enterobatteri patogeni [Articolo] // Periodico dell'istituto zooprofilattico sperimentale delle regioni Lazio e toscana. - 9 Novembre 2012. - p. 46.
14. **Snary E. L. et al** A Quantitative Microbiological Risk Assessment for Salmonella in Pigs for the European Union [Rivista] // Risch Anal (36):3. - 2016. - p. 417.
15. **Tedesco-Maiullari RM Guarana A.** Enterobatteri produttori di beta.lattamasi a spettro esteso [Rivista] // Le Infezioni di Medicina. - 2012. - p. 7.