

CONTAMINAZIONE DA *SALMONELLA* SPP. IN DUE MATTATOI DEL CENTRO ITALIA: UN APPROCCIO QUANTITATIVO

CONTAMINATION BY *SALMONELLA* SPP. IN TWO SLAUGHTERHOUSES IN CENTRAL ITALY: A QUANTITATIVE APPROACH

MASSACCI F.R., CIUTI F., CUCCO L., DE LUCA S., MARESCA C., MEDICI L., PANICCIÀ M., SCOCCIA E., SILENZI V., PEZZOTTI G., MAGISTRALI C.F.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche (IZSUM)

Parole chiave: *Salmonella* spp., suini, carica

Keywords: *Salmonella* spp., swine, load

Riassunto

Scopo di questo lavoro è stato quello di indagare il livello di contaminazione da *Salmonella* spp. nei contenuti ciecali e sulle carcasse di suini macellati presso due mattatoi del Centro Italia. Il campionamento è stato effettuato con l'obiettivo di stimare la prevalenza di suini fortemente contaminati (carica ciecale ≥ 3 log) da *Salmonella* spp. pari al 12%. Prima della macellazione sono stati prelevati tamponi ambientali. I livelli di prevalenza di *Salmonella* spp. da contenuto ciecale sono stati pari a 17,33% (IC95% 15%-20%) nel mattatoio A ed a 34,64% (IC95% 29,37%-40,30%) nel mattatoio B. La prevalenza di *Salmonella* spp. nei tamponi carcassa è stata rispettivamente dello 0,67% (IC95% 0,42%-1,46%) e del 7,19% (IC95% 4,66%-10,84%). I risultati quantitativi mostrano una prevalenza di suini fortemente contaminati pari al 7% (IC95% 4,49%-10,66%) nel mattatoio A e 11,44% (IC95% 8,20%-15,67%) nel B. Nel mattatoio A tutti i tamponi ambientali sono risultati negativi, mentre nel B 7/59 erano positivi, con la presenza dello stesso sierotipo sulle carcasse macellate nella stessa giornata. I sierotipi più frequenti sono stati *S. Derby*, variante monofasica di *Salmonella* Typhimurium (4,[5],12:i:-), nel 75% caratterizzata da resistotipo ASSuT. In conclusione, i livelli di contaminazione differivano nei due mattatoi, probabilmente in ragione delle caratteristiche strutturali degli stessi. I suini hanno presentato differenti livelli di contaminazione ciecale da *Salmonella*, con un livello di prevalenza non trascurabile di suini fortemente contaminati.

Abstract

The aim of this work was to investigate the contamination by *Salmonella* spp. in cecal contents and carcass swabs collected at two slaughterhouses in Central Italy. The sample size was calculated to estimate a 12% prevalence of pigs highly contaminated by *Salmonella* spp. (HCP, cecal load ≥ 3 log). Environmental swabs were taken before slaughter on each day. The prevalence of *Salmonella*-positive cecal contents was estimated as 17,33% (CI95% 15%-20%) in slaughterhouse A, and 34,64% (CI95% 29,37%-40,30%) in slaughterhouse B, whereas *Salmonella*-positive carcass swabs was estimated as 0,67% (CI95% 0,42%-1,46%) and 7,19% (CI95% 4,66%-10,84%), respectively. The HCP prevalence was 7% (CI95% 4,49%-10,66%) in slaughterhouse A and 11,44% (CI95% 8,20%-15,67%) in slaughterhouse B. All the environmental swabs from slaughterhouse A tested negative for *Salmonella* spp. In slaughterhouse B, 7 out of 59 environmental swabs tested positive, with the same serotype isolated from the environment and from carcasses of the same day. The prevalent serotypes were *S. Derby*, *S. 4,[5],12:i:-*, with ASSuT being the most common (75%) resistotype of

S. (4,[5],12:i:-). In conclusion, the *Salmonella* spp. contamination was different in the two slaughterhouses and this was probably due to an abattoir effect. Pigs showed different loads of *Salmonella* spp. in caeca, with a non-negligible prevalence of highly contaminated pigs.

INTRODUZIONE

L'infezione da *Salmonella* spp. è una delle zoonosi più diffuse tra quelle che vengono trasmesse attraverso gli alimenti (EFSA, 2012); la carne suina, dopo le uova e la carne di pollo, rappresenta una delle più importanti fonti di contaminazione per l'uomo (EFSA, 2006). Da un decennio, anche grazie all'applicazione dei piani di controllo per *Salmonella enterica* nel comparto avicolo, si è assistito ad una riduzione progressiva dei casi nell'uomo nella comunità europea (EFSA, 2014). Allo stesso tempo, è accresciuta proporzionalmente l'importanza di altre fonti di *Salmonella* spp., tra cui quello della carne suina (EFSA, 2015). Da un recente studio dell'EFSA è emerso infatti che in Italia il 73% dei casi di salmonellosi registrati nell'uomo sono riconducibili al suino (Pires, 2012).

La struttura della filiera produttiva del suino è molto diversa da quella avicola, e questo rende l'applicazione di piani di controllo per *Salmonella* spp. più complessa.

Pertanto una migliore conoscenza della contaminazione da *Salmonella* spp. lungo la filiera produttiva, dall'allevamento alla macellazione, fino al prodotto finito, può contribuire a impostare programmi di riduzione del rischio. Tuttavia, per una corretta stima di questo sono necessari dati di carattere quantitativo (Kramer, 2011). È chiaro, come sottolineato da un report EFSA, che il rischio contaminazione non sia legato solamente alla presenza/assenza del batterio, ma anche alla carica batterica associata (EFSA, 2008). Infatti, i processi produttivi che seguono la macellazione sono in grado di ridurre la carica microbica batterica, ma l'efficacia di questo processo dipende dal livello di contaminazione iniziale del campione (van Hoek, 2012). La maggior parte dei dati disponibili in letteratura si limitano a valutazioni di tipo qualitativo, riportando le variazioni di prevalenza di *Salmonella* spp. nei diversi comparti lungo la filiera.

Nonostante siano disponibili pochi dati in merito all'entità delle escrezioni fecali di *Salmonella* spp. nei suini infettati naturalmente, 100 ufc/g rappresentano il valore riscontrato più frequentemente, ad eccezione di casi di salmonellosi clinica o in prossimità del momento di infezione, durante i quali tali valori tendono ad essere più elevati (EFSA, 2008). Livelli di escrezione riscontrabili in condizioni naturali sono stati infatti recentemente descritti da Pires (2013), che hanno registrato la sporadica presenza di suini eliminatori di cariche batteriche elevate (*high shedder*) raggruppati in piccoli *cluster*. Modelli matematici che hanno valutato le modalità di trasmissione di *Salmonella* spp. nel magronaggio e ingrasso hanno attribuito un ruolo chiave al numero di *high shedder* nella diffusione dell'infezione in allevamento (Smid, 2014)

È stato ipotizzato che anche al macello la presenza di suini ad elevata contaminazione possa causare un maggiore impatto sul livello di contaminazione delle carcasse (Nauta, 2013).

Scopo di questo lavoro è stato descrivere, da un punto di vista quantitativo, la contaminazione da *Salmonella* spp. nei contenuti ciecali e nelle carcasse di suini macellati in due mattatoi del Centro Italia.

MATERIALE E METODI

Campionamento

L'indagine è stata svolta da Aprile a Novembre 2014 in due mattatoi dell'Italia centrale.

Il primo mattatoio (A) macellava circa 40 suini per ogni giornata di macellazione, e una sola volta alla settimana; inoltre, la provenienza dei suini era locale (allevamenti in un raggio di

circa 100 km) ed il macello era sprovvisto di stalle di sosta.

Il secondo mattatoio (B) macellava circa 2000 suini/die in due giornate alla settimana, la provenienza dei suini macellati era nazionale. Questo mattatoio era fornito di stalle di sosta.

La numerosità campionaria è stata calcolata per stimare la prevalenza di suini che presentavano una carica di *Salmonella* spp. a livello ciecale maggiore o uguale a 1000 batteri/grammo per giornata di macellazione. Il numero di animali campionati è stato rappresentativo del numero dei suini macellati nel corso della giornata in cui si è effettuato il campionamento. Si è considerato un livello di confidenza del 95%, tenendo conto di una prevalenza attesa del 12% e una precisione del 10 %. Il livello di prevalenza attesa è stato calcolato sulla base degli esiti di un progetto pilota.

Presso l'ambiente di macellazione, per ogni giornata di macellazione, sono stati effettuati dei campioni ambientali prima dell'introduzione degli animali. Il prelievo è stato effettuato con spugne pre-umidificate con acqua peptonata tamponata (Spongebags, Solar Biologicals Inc), eseguendo il campionamento da almeno otto diversi punti lungo la catena di macellazione (vasche di scottatura, scivolo carcasce, coltelli inizio pedana, carrelli porta visceri, ganci, due seghe ad acqua, coltelli fine pedana).

In ciascuna giornata di macellazione, i suini oggetto di prelievo sono stati selezionati mediante randomizzazione semplice. Per ciascun animale è stato effettuato un prelievo di contenuto ciecale e tamponi carcassa. Il campionamento della carcassa è avvenuto prima del lavaggio finale. Il prelievo è stato effettuato in base a quanto previsto dalla Norma UNI EN ISO 17604:2003/E, in cinque punti diversi (arto posteriore distale, coscia, addome laterale, regione media dorsale e addome mediale), per ciascuna mezzena, utilizzando una mascherina monouso e spugne pre-umidificate con acqua peptonata tamponata (Spongebags, Solar Biologicals Inc) per una superficie totale di 1000 cm² circa. Tutti i campioni sono stati mantenuti a temperatura di refrigerazione e conferiti, successivamente, al laboratorio di analisi ed esaminati entro 24 ore.

Isolamento batterico

La ricerca di *Salmonella* spp. è stata effettuata attraverso una tecnica miniaturizzata secondo la norma ISO/TS 6579-2:2012/A1, che fornisce un metodo per la numerazione di *Salmonella* spp. mediante calcolo del *most probable number* (MPN).

In breve, si è effettuata una prima semina di 5 grammi di contenuto ciecale in 45 ml di acqua peptonata tamponata (APT) e, a partire da questa, sono state effettuate altre diluizioni in base 5 sempre in APT. Tutte le diluizioni sono state effettuate in triplo ed incubate a 37±1 °C per 18 ore. I tamponi carcassa sono stati risospesi in 225 ml di APT e successivamente diluiti come sopra descritto.

Dopo l'incubazione le diluizioni sono state seminate su Modified Semisolid Rappaport Vassiliadis (Biokar Diagnostics), addizionato con novobiocina allo 0.01%, e incubate a 41,5°C per 24 - 48 ore. Crescite opache lontano dal sito di inoculo su MSRVR sono state considerate sospette e di conseguenza seminate sul terreno solido selettivo Xylose Lysine Deoxycolate agar (Biolife) quindi incubate a 37 °C per 24 ore. Le colonie tipiche sono state confermate biochimicamente (Api Rapid 20E, bioMérieux) e sierologicamente (*Salmonella* test sera omnivalent/ polyvalent, Siemens).

Il calcolo del MPN del è stato effettuato in base a quanto descritto dalla norma ISO 7218:2007/E. È stata effettuata una categorizzazione dei campioni di contenuto ciecale e tampone carcassa in base ai risultati della prova. Il valore numerico è stato trasformato nel corrispondente logaritmo: i valori inferiori a 100 MPN/g/o spugna sono stati inclusi nella prima categoria (<2 log); nella seconda categoria (2 log) i valori compresi tra 2 e 2,99 log; nella terza categoria (3 log) i valori compresi tra 3 e 3,99 log e così per quelle successive.

I suini sono stati successivamente categorizzati sulla base della carica di *Salmonella* spp. rilevata a livello ciecale. Quando il valore di MPN ottenuto era pari o superiore a 1000, il suino veniva considerato come altamente contaminato.

Tipizzazione sierologica e test di sensibilità agli antimicrobici

La caratterizzazione sierologica dei ceppi di *Salmonella* spp. è stata eseguita secondo lo schema di Kauffmann-White-Le Minor (Popoff, 2003).

Il saggio di sensibilità agli antimicrobici è stato eseguito sugli isolati di *Salmonella* spp. tramite la tecnica della diffusione in agar secondo le linee guida CSLI (2002; 2007). Gli antimicrobici testati sono stati quelli del pannello Enter-net: Ampicillina (AMP 10 µg); Amoxicillina + Acido Clavulanico (AMC 30 µg); Ceftazidime (CAZ 30 µg); Cefotaxime (CTX 30 µg); Cefalotina (KF 30 µg); Ciprofloxacina (CIP 5 µg); Colistina solfato (CT 10 µg); Cloramfenicolo (C 30 µg); Gentamicina (CN 10 µg); Kanamicina (K 30 µg); Acido Nalidixico (NA 30 µg); Sulfamides (Su 300 µg); Streptomina (S 10 µg); Tetraciclina (Te 30 µg) e Trimethoprim + Sulfametossazolo (SXT 25 µg).

RISULTATI

Prevalenza di *Salmonella* spp. per mattatoio e tipologia di campione

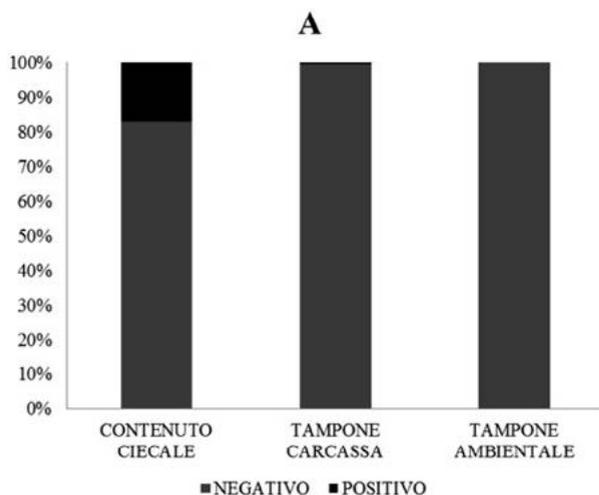
Nel mattatoio A sono state campionate 12 giornate, da aprile a dicembre 2014. Complessivamente, sono stati prelevati 708 campioni, di cui 300 campioni di contenuto ciecale, 300 tamponi carcassa e 108 campioni di tamponi ambientali.

La prevalenza di *Salmonella* spp. nei campioni di contenuto ciecale è risultata del 17,33% (IC95% 15%-20%), mentre nei tamponi carcassa dello 0,67% (IC95% 0,42%-1,46%) (Figura 1).

Tutti i tamponi ambientali (n=108) hanno dato esito negativo.

Figura 1: Diagramma a barre che illustra la distribuzione dei campioni prelevati presso il mattatoio A, distinti per tipologia ed esito.

Figure 1: Bar chart showing the distribution of samples of different origin from slaughterhouse A, divided according to test results.



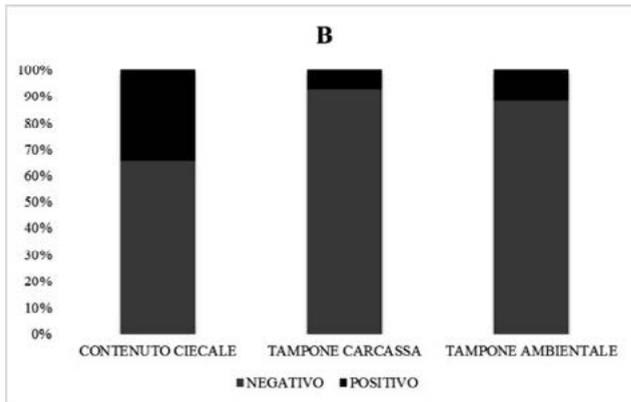
Nel mattatoio B sono state campionate 7 giornate, da aprile a dicembre 2014. In totale, sono stati prelevati 671 campioni: 306 campioni di contenuto ciecale, 306 tamponi carcassa e 59 tamponi ambientali.

La prevalenza di *Salmonella* spp. nel contenuto ciecale è stata del 34,64% (IC95% 29,37%-40,30%); quella dei campioni carcassa del 7,19% (IC95% 4,66%-10,84%) (Figura 2).

Complessivamente, 7 su 59 tamponi ambientali (11,9%) hanno fornito esito positivo per *Salmonella* spp.

Figura 2: Diagramma a barre che illustra la distribuzione dei campioni prelevati presso il mattatoio B, distinti per tipologia ed esito.

Figure 2: Bar chart showing the distribution of samples of different origin from slaughterhouse B, divided according to test results.

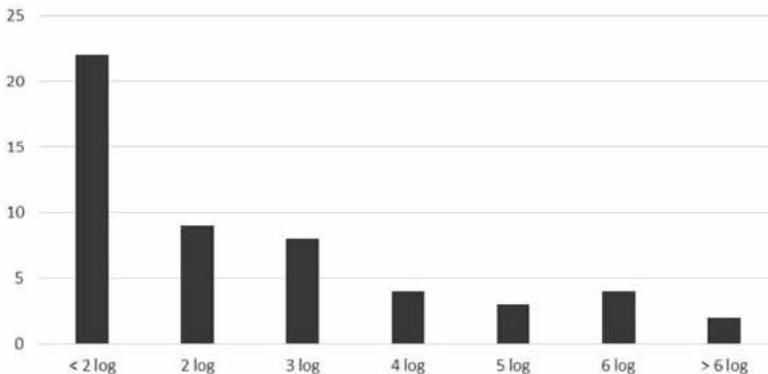


Prevalenza e distribuzione dei suini fortemente contaminati

La distribuzione dei suini sulla base della quantità di *Salmonella* spp. riscontrata a livello ciecale nel mattatoio A è illustrata in figura 3.

Figura 3: mattatoio A. Diagramma a barre che mostra la distribuzione dei campioni sulla base della quantità di *Salmonella* spp. presente a livello ciecale, espressa come logaritmo.

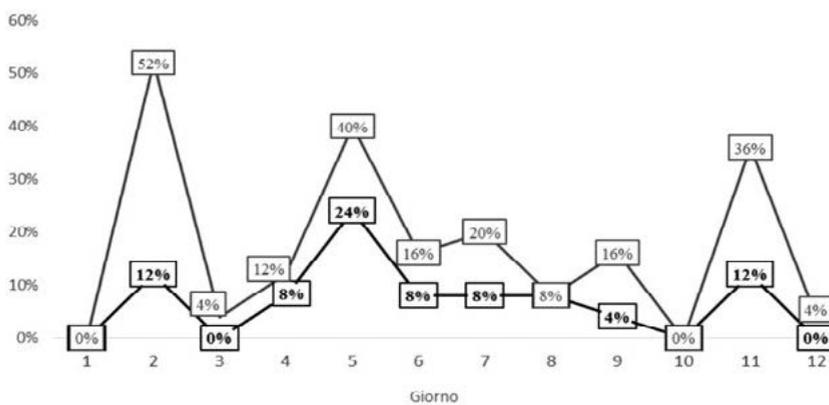
Figure 3: slaughterhouse A. Bar chart showing the distribution of samples according to the *Salmonella* spp. load in cecum, expressed as log.



La prevalenza di suini fortemente contaminati nel mattatoio A è stata del 7% (IC95% 4,49%-10,66%). L'andamento della prevalenza di suini risultati positivi per *Salmonella* spp. a livello ciecale e il valore di prevalenza di suini fortemente contaminati rilevati nella stessa giornata, è indicato in figura 4.

Figura 4 : mattatoio A. Prevalenza di suini positivi per *Salmonella* spp. a livello ciecale (linea grigio) e prevalenza di suini fortemente contaminati (linea nera) nelle diverse giornate di prelievo.

Figure 4: slaughterhouse A. The prevalence of *Salmonella* spp. positive pigs (cecal content, grey line) together with the prevalence of high-contaminated pigs (black line) on each sampling day are shown.

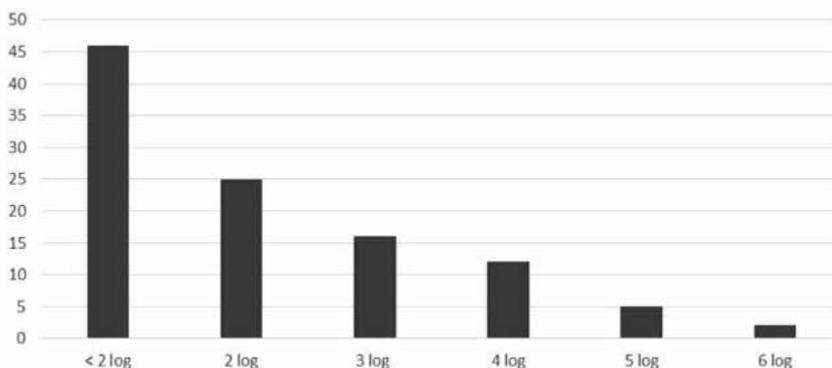


Solo due campioni di tampone carcassa sono risultati positivi nel mattatoio A, con una carica microbica < 2 log.

La distribuzione dei suini sulla base della quantità di *Salmonella* spp. riscontrata a livello ciecale nel mattatoio B è illustrata in figura 5.

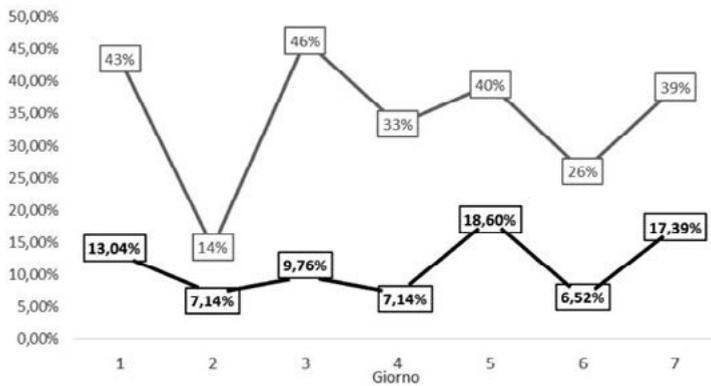
Figura 5: mattatoio B. Diagramma a barre che mostra la distribuzione dei campioni sulla base della quantità di *Salmonella* spp. presente a livello ciecale, espressa come logaritmo.

Figure 5: slaughterhouse B. Bar chart showing the distribution of samples according to the *Salmonella* spp. load in cecum, expressed as log.



La prevalenza di suini fortemente contaminati nel mattatoio B si è collocata al 11,44% (IC95% 8,20%-15,67%). L'andamento della prevalenza di suini positivi per *Salmonella* spp. a livello ciecale e di suini fortemente contaminati, distinto per giornata di macellazione, nel mattatoio B, è evidenziata nella figura 6.

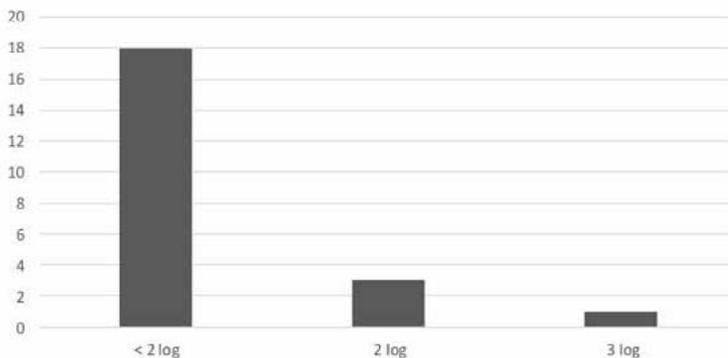
Figura 6: mattatoio A. Prevalenza di suini positivi per *Salmonella* spp. a livello ciecale (linea grigio) e prevalenza di suini fortemente contaminati (linea nera) nelle diverse giornate di prelievo.
Figure 6: slaughterhouse A. The prevalence of *Salmonella* spp. positive pigs (cecal content-grey line) together with the prevalence of high-contaminated pigs (black line) on each sampling day are shown.



I risultati relativi alla contaminazione delle carcasse nel mattatoio B sono illustrati nelle figure 7 e 8.

Solo un tampone carcassa, prelevato nella seconda giornata di macellazione, ha presentato un valore pari a 3 log.

Figura 7: Diagramma a barre che illustra la distribuzione dei campioni carcassa prelevati presso il mattatoio B, distinti in base alla carica di *Salmonella* spp, espressa come logaritmo.
Figure 7: Bar chart showing the distribution of carcass swabs from slaughterhouse B, divided according to *Salmonella* spp. load, expressed as a logarithm.



Analisi per tipizzazione batterica e giornata di macellazione

I risultati della tipizzazione degli isolati di *Salmonella* spp. nel mattatoio A da contenuto ciecale sono indicate in tabella 1. Complessivamente, sono stati tipizzati 52 ceppi batterici: il 54% era rappresentato da *Salmonella* Derby; il 23% da *Salmonella* Rissen, il 21% dalla variante monofasica di *Salmonella* Typhimurium (4,[5],12:i:-) e infine il 2% da *Salmonella* Livingstone (tabella 1). I due ceppi provenienti da tamponi carcassa positivi nelle giornate 7 e 9 sono stati rispettivamente attribuiti a variante monofasica di *Salmonella* Typhimurium (4,[5],12:i:-) e *Salmonella* Derby.

Tabella 1: risultati della tipizzazione di ceppi isolati da contenuto ciecale nel mattatoio A, per giorno di macellazione.

Table 1: slaughterhouse A: *Salmonella* spp. isolates from cecal contents, divided according to the belonging serotype and the day of sampling.

MATTATOIO A	Risultato tipizzazione				Totale
	S. Derby	S. Livingstone	S. Rissen	S. 4,[5],12:i:-	
Giorno 1					0
Giorno 2		1	12		13
Giorno 3				1	1
Giorno 4	1			2	3
Giorno 5	10				10
Giorno 6	4				4
Giorno 7				5	5
Giorno 8				2	2
Giorno 9	4				4
Giorno 10					0
Giorno 11	8			1	9
Giorno 12	1				1
Totale	28 (54%)	1 (2%)	12 (23%)	11 (21%)	52 (100%)

I risultati della tipizzazione degli isolati di *Salmonella* spp. nel mattatoio B da contenuto ciecale sono indicate in tabella 2. In questo mattatoio, la maggior parte dei ceppi è stata ricondotta a variante monofasica di *Salmonella* Typhimurium (4,[5],12:i:-), al quale sierotipo corrispondeva il 36% del totale degli stipiti. Isolati appartenenti a questo sierotipo sono stati evidenziati in tutte le giornate di macellazione. Una percentuale simile, 27%, di isolati apparteneva invece a *Salmonella* Derby.

I risultati della tipizzazione degli isolati di *Salmonella* spp. nel mattatoio A da carcassa sono indicati in tabella 3. In questo caso, la maggior parte degli isolati (27%) apparteneva a *Salmonella* Rissen e *Salmonella* Panama.

Tabella 2: risultati della tipizzazione di ceppi isolati da contenuto ciecale nel mattatoio B per giorno di macellazione.

Table 2: slaughterhouse B: *Salmonella spp.* isolates from cecal contents, divided according to the belonging serotype and the day of sampling

MATTATOIO B	Risultato tipizzazione												Tot.
	S. Anatum	S. Derby	S. Enteritidis	S. Give	S. Goldcoast	S. Infantis	S. Livingstone	S. London	S. Panama	S. Rissen	S. Stanley	S. 4,[5],12:i:-	
Giorno 1		6					1	2		4		7	20
Giorno 2					5							1	6
Giorno 3	2	4	1			5				2		5	19
Giorno 4		7								2		5	14
Giorno 5		2						3		4	2	6	17
Giorno 6		2		1					2	1		6	12
Giorno 7		8								2		8	18
Totale	2 (2%)	29 (27%)	1 (1%)	1 (1%)	5 (5%)	5 (5%)	1 (1%)	5 (5%)	2 (2%)	15 (13%)	2 (2%)	38 (36%)	106

Tabella 3: risultati della tipizzazione di ceppi isolati da tampone carcassa nel mattatoio B per giorno di macellazione.

Table 3: slaughterhouse B: *Salmonella spp.* isolates from carcass swabs, divided according to the belonging serotype and the day of sampling.

MATTATOIO B	Risultato Tipizzazione							Totale
	S. Derby	S. London	S. Rissen	S. Panama	S. Goldcoast	S. Infantis	S. 4,[5],12:i:-	
Giorno 1	2	2	1					5
Giorno 2					1		1	2
Giorno 3			1			1		2
Giorno 4								0
Giorno 5	1		3	6			2	12
Giorno 6			1					1
Giorno 7								0
Totale	3(14%)	2(9%)	6(27%)	6(27%)	1(4,5%)	1(4,5%)	3(14%)	22

Per quanto riguarda gli isolati da tamponi ambientali questi sono stati ricondotti per il 43% alla variante monofasica di *Salmonella* Typhimurium (4,[5],12:i:-), per il 29 % a *Salmonella* Derby e per il 14% da Rissen e Goldcoast (Tabella 4).

Tabella 4: risultati della tipizzazione di ceppi isolati dai tamponi ambientali nel mattatoio B per giorno di macellazione.

Table 4: slaughterhouse B: *Salmonella* spp. isolates from environmental samples, divided according to the belonging serotype and the day of sampling.

	MATTATOIO B				Totale
	S. Derby	S. Rissen	S. Goldcoast	S. 4,[5],12:i:-	
Giorno 1				1	1
Giorno 2			1	1	2
Giorno 3	1				1
Giorno 4		1			1
Giorno 5	1			1	2
Giorno 6					0
Giorno 7					0
Totale	2 (29%)	1(14%)	1(14%)	3(43%)	7(100%)

Analisi di antibiotico-resistenza

Il test di sensibilità agli antimicrobici è stato eseguito su tutti i ceppi risultati positivi (182) per *Salmonella* spp. (Tabella 5)

Tabella 5: risultati della valutazione della sensibilità agli antimicrobici, divisi per sierotipo. Sono riportati tutti i sierotipi isolati in almeno due occasioni.

Table 5: antimicrobial susceptibility of the *Salmonella* spp. serovars. Only the serovars isolated at least two times are shown.

Sierotipo	Totale	Sensibili (%)	Numero e percentuali di isolati resistenti a Tetraciclina (Te), Ampicillina (AMP), Streptomicina (S), Sulfonamidi (Su), Sulfametossazolo (SXT), Acido nalidixico (NA) e Cloramfenicolo (C)						
			Te (%)	AMP (%)	S (%)	Su (%)	SXT (%)	NA (%)	C (%)
S. Derby	61	27 (44)	31 (51)	1 (2)	2 (3)	2 (3)	-	-	-
S. 4,[5],12:i:-	53	1 (2)	44 (83)	50 (94)	48 (90)	48 (90)	8 (15)	-	-
S. Rissen	33	15 (46)	9 (27)	2 (6)	-	-	-	6 (18)	1 (3)
S. Panama	8	7 (88)	1 (12)	1 (12)	1 (12)	1 (12)	1 (12)	-	-
S. London	7	4 (57)	-	-	-	3 (43)	-	-	-
S. Goldcoast	6	6 (100)	-	-	-	-	-	-	-
S. Infantis	6	6 (100)	-	-	-	-	-	-	-
S. Anatum	2	2 (100)	-	-	-	-	-	-	-
S. Livingstone	2	2 (100)	-	-	-	-	-	-	-
S. Stanley	2	-	-	-	-	-	-	2 (100)	-

Dei trentuno isolati di *S. Derby* resistenti a Tetraciclina, dieci presentavano il resistotipo SSuT, due il resistotipo ASSuT+SXT ed uno ASuT.

La maggior parte (75%) degli isolati di variante monofasica di *Salmonella* Typhimurium (4,[5],12:i:-) presentava un resistotipo ASSuT, e di questi otto isolati erano anche resistenti a SXT. Inoltre, un isolato di *S. Typhimurium* (4,12,i:-) ASSuT presentava resistenze anche per Amoxicillina e acido clavulanico, Cefalosina, Ceftriaxone, Ceftadizime e Gentamicina. Un isolato di *S. Panama* ha mostrato a un resistotipo ASSuT-SXT.

Infine, gli unici due isolati di *S. Enteritidis* e di *S. Give*, erano sensibili a tutti gli antimicrobici saggiati.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

I livelli di prevalenza di *Salmonella* spp. nei contenuti ciecali rilevati nel presente lavoro indicano valori vicini a quelli riportati in letteratura (Bonardi nel 2003; Bonardi, 2013). Per quanto riguarda i livelli di contaminazione delle carcasse, questi si collocavano per il mattatoio B a valori di prevalenza simili a quelli riportati dall'EFSA nel 2008 e da Bonardi nel 2013, mentre il mattatoio A ha presentato valori di contaminazioni molto più contenuti.

Il livello di contaminazione da *Salmonella* spp. nel suino dipende non solo dall'allevamento di provenienza, ma anche dalla durata del trasporto e dall'eventuale periodo trascorso nelle stalle di sosta: entrambe queste fasi costituiscono infatti una fonte di stress per gli animali e una possibilità di trasmissione dell'infezione (Magistrali, 2008; Boughton, 2007; Rostagno et al., 2003). In letteratura, il numero di suini macellato per giornata, è risultato essere correlato con il rischio che i suini albergassero *Salmonella* spp. a livello linfonodale (Marier, 2014).

I suini portatori possono quindi contaminare l'ambiente di macellazione in diversi modi: attraverso la fase di depilazione e pulizia delle carcasse le feci possono infatti arrivare alla superficie delle stesse; inoltre, durante le fasi di eviscerazione si può osservare una perdita di contenuto intestinale. *Salmonella* spp. può quindi contaminare la stessa carcassa, altre carcasse macellate nella medesima giornata (cross contaminazione) o l'ambiente. Nell'ambiente di macellazione, *Salmonella* spp. può divenire parte della flora residente, anche per la difficoltà di decontaminare in modo efficace le attrezzature (Smid, 2014).

La differenza da noi osservata tra i due mattatoi può quindi dipendere da numerosi fattori, tra cui il livello di contaminazione degli animali in entrata, la provenienza dei suini, l'assenza di stalle di sosta e la contaminazione residuale delle strutture a inizio macellazione. Un dato analogo è stato per altro riscontrato anche nel corso di un nostro precedente lavoro (D'Avino, 2014).

Nel corso del presente lavoro, un diverso livello di contaminazione delle strutture è stato descritto nei due mattatoi, infatti mentre nel mattatoio A nessun tampone ambientale ha dato esito positivo per *Salmonella* spp., nel mattatoio B sono stati riscontrati livelli di contaminazioni prossimi al 12%. Inoltre, è stato possibile isolare nella stessa giornata di macellazione lo stesso sierotipo da tamponi ambientali e da carcasse, sottolineando l'importanza della contaminazione di origine ambientale (van Hoek, 2012; Gomes-Neves, 2014).

Un'indagine EFSA (2008) indica i sierotipi isolati nei due mattatoi, *S. Derby*, S.4,[5],12:i:- e *S. Rissen*, come tra i cinque più frequenti nei suini italiani, dato confermato anche da Bonardi (2013), che ha riportato i sierotipi Derby, variante monofasica di *Salmonella* Typhimurium (4,[5],12:i:-) e Rissen come quelli prevalenti a livello ciecale nel corso della sua indagine. Nel corso del nostro studio, più del 80% degli isolati è stato ricondotto a *S. Derby* e variante monofasica di *Salmonella* Typhimurium (4,[5],12:i:-) o *S. Rissen*. Inoltre, la maggior parte degli isolati di variante monofasica di *Salmonella* Typhimurium (4,[5],12:i:-) (75%) si sono dimostrati appartenenti al resistotipo ASSuT. Tale resistotipo è stato segnalato negli ultimi dieci anni in Europa, sia in casi di infezione da *Salmonella* spp. nell'uomo, sia nei suini e nella carne suina (Hopkins, 2010) ed è considerato una variante di *S. Typhimurium* di particolare interesse da un punto di vista della sanità pubblica.

Considerando la distribuzione dei sierotipi nelle diverse giornate di macellazione, è possibile osservare come i sierotipi più frequenti siano stati riscontrati in più giornate di macellazione ed in diverse matrici, mentre i sierotipi meno frequenti hanno mostrato una distribuzione meno omogenea.

Per quanto riguarda i dati relativi alla carica di *Salmonella* spp. presente a livello ciecale, la maggior parte dei campioni risultati positivi aveva un livello di contaminazione pari o inferiore

a 2 log/g. In letteratura, sono disponibili pochi dati quantitativi di contaminazione da *Salmonella* spp. al macello, inoltre la maggior parte di questi si riferiscono a valori di prevalenza molto più contenuti (Nauta, 2013; van Hoek, 2012). In un recente lavoro condotto in Danimarca, solo il 2,6% dei contenuti ciecali era positivo e solo lo 0,18% superava le 670 UFC (Nauta, 2013). Nel presente lavoro, in entrambi i mattatoi, è stato possibile descrivere la presenza di suini fortemente contaminati, stimata del 7 % nel macello A e dell'11,44% nel mattatoio B, con livelli di prevalenza simili a quelli attesi, sulla base dell'esito di un lavoro pilota.

Per quanto riguarda i dati quantitativi di contaminazione per *Salmonella* spp. delle carcasse, questi sono risultati generalmente bassi, inferiori a 2 log/1000cm² di superficie; inoltre, è necessario considerare che questa carica si riferisce ad un prelievo effettuato prima dell'ultimo lavaggio.

In conclusione, nel corso del presente lavoro la prevalenza di *Salmonella* spp. a livello ciecale, di tamponi carcassa e di tamponi ambientali, è stata molto diversa nei due mattatoi campionati, confermando quanto già segnalato in letteratura sulla variabilità della contaminazione da *Salmonella* in base al mattatoio (Arguello, 2013).

I suini hanno presentato differenti livelli di contaminazione ciecale da *Salmonella* spp., generalmente collocati al di sotto di 100 ufc/g. Tuttavia, è stato possibile descrivere una prevalenza non trascurabile di suini fortemente contaminati.

BIBLIOGRAFIA

Anonymous. EN ISO 17604:2003/E “Microbiology of food and animal feeding stuffs – Carcass sampling for microbiological analysis” ISO 17604:2003/E

Anonymous. EN ISO 6579-2:2012/A1. “Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp. – Amendment 1: Annex D: Detection of *Salmonella* spp. in animal faeces and in environmental samples from the primary production stage” ISO/TS 6579-2/2012(E)

Anonymous. EN ISO 7218:2007/E. “Microbiology of food and animal feeding stuffs – General requirements and guidance for microbiological examinations” ISO 7218:2007(E)

Arguello H1, Alvarez-Ordoñez A, Carvajal A, Rubio P, Prieto M.(2013). “Role of slaughtering in *Salmonella* spreading and control in pork production.” *Journal of Food Protection*, 2013 May;76(5):899-911.

Bonardi S., Brindani F., Pizzin G., Lucidi L., S’Incau M., Liebana E., Morabido S. (2003) “Detection of *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica* and verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in pigs at slaughter in Italy” *International Journal of Food Microbiology*, 2003 Aug 15;85(1-2):101-10.

Bonardi S, Bassi L, Brindani F, D’Incau M, Barco L, Carra E, Pongolini S. (2013) “Prevalence, characterization and antimicrobial susceptibility of *Salmonella enterica* and *Yersinia enterocolitica* in pigs at slaughter in Italy.” *International Journal of Food Microbiology*, 2013 May 15;163(2-3):248-57

Boughton C, Egan J, Kelly G, Markey B, Leonard N. (2007) “Quantitative examination of *Salmonella* spp. in the lairage environment of a pig abattoir”. *Foodborne Pathogens and Disease*, 4(1):26-32

Clinical and Laboratory Standards Institute (2002). “Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; approved standard—NCCLS document M31-A2” Vol. 22 No. 6, 2nd ed. (ISBN 1-56238-461-9). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898, USA.

Clinical and Laboratory Standards Institute (2007). “Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, seventeenth informational supplement—NCCLS document M100-S17” Vol. 27 No. 1. (ISBN 1-56238-461-9). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898, USA.

D’Avino N, Cucco L, Betti Sorbelli V, Ciuti F, Ortenzi R, Paniccà M, Staffolani M, Pezzotti G, Magistrali C F (2014) “Diffusione di Salmonella spp. lungo la filiera produttiva suina in Italia centrale” *Large Animal Review*, 2014, 20, 157-163

European Food Safety Authority, 2006. “Opinion of the Scientific Panel on Biological Hazards on Risk assessment and mitigation options of Salmonella in pig production.” *The EFSA Journal* 341, 1–131. Available online at: <http://www.efsa.europa.eu/it/efsajournal/pub/341.htm>

European Food Safety Authority, 2015. “The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013.” *The EFSA Journal* 2015;13(1):3991. Available online at: <http://www.efsa.europa.eu/it/efsajournal/doc/3991.pdf>

European Food Safety Authority, (2008). “Quantitative Microbiological Risk Assessment on Salmonella in Slaughter and Breeder pigs: Final Report.” Available online at: <http://www.efsa.europa.eu/en/supporting/pub/46e.htm>

European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control (2008) “Report of the task force on zoonosis data collection on the analysis of the baseline survey on the prevalence of Salmonella in slaughter pigs. Part A.” *The EFSA Journal*, 135: 1-111. Available online at: <http://www.efsa.europa.eu/it/scdocs/doc/1377.pdf>

European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control (2012) “The European Union summary report on trends and sources of zoonoses zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2010”. *The EFSA Journal* 10, 2597. Available online at: <http://www.efsa.europa.eu/it/search/doc/2597.pdf>

European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control 2014. “The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2012.” *The EFSA Journal* 2014;12(2):3547. Available online at: <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/EU-summary-report-zoonoses-food-borne-outbreaks-2012.pdf>

Gomes-Neves E., Antunes P., Manageiro V., Gärtner F., Caniça M., da Costa J.M., Peixe L. (2014) “Clinically relevant multidrug resistant Salmonella enterica in swine and meat handlers at the abattoir” *Veterinary Microbiology*, 2014 Jan 10; 168 (1):229-33.

Hopkins K.L., Kirchner m., Gueraa B., Granier S.A., Lucarelli C., Porrero M.C., Jakubczack

A., Threlfall E.J., Mevius D.J. (2010) "Multiresistant Salmonella entericaserovar 4, (5), 12:i in Europe: a new pandemic strain?" *Eurosurveillance* 15 (22). Available online at: <http://www.eurosurveillance.org>.

Krämer N1, Löfström C, Vigre H, Hoorfar J, Bunge C, Malorny B. (2011) "A novel strategy to obtain quantitative data for modelling: combined enrichment and real-time PCR for enumeration of salmonellae from pig carcasses". *International Journal of Food Microbiology*, 2011 Mar 1;145 Suppl 1:S86-95.

Magistrali C., Dionisi A.M., de Curtis P., Cucco L., Vischi O., Scuota S., Zicavo A., Pezzotti G. (2008) "Contamination of Salmonella in a pig finishing herd, from the arrival of the animals to the slaughterhouse." *Research in Veterinary Science*, 85: 204-207.

Marier E.A., Snow L.C., Floyd T., McLaren I.M., Bianchini J., Cook A.J., Davies R.H. (2014). "Abattoir based survey of Salmonella in finishing pigs in the United Kingdom 2006-2007." *Preventive Veterinary Medicine*, 1;117(3-4):542-53.

Nauta M., Barfod K., Hald T., Sorensen A.S., Emborg H. D., Aabo S. (2013) Prediction of Salmonella carcass contamination by a comparative quantitative analysis of E. coli and Salmonella during pig slaughter. *International Journal of Food Microbiology*, 166: 231-237.

Pires A.F.A., Funk J.A., Lim A., Bolin S.R. (2013) "Enumeration of Salmonella in feces of naturally infected pigs." *Foodborne Pathogens and Disease*, 10(11):933-7

Pires S.M., de Knecht L., Hald T. (2012) "Estimation of the relative contribution of different food and animal sources to human Salmonella infections in the European Union." EFSA-Q-2010-00685. Supporting publications, <http://www.efsa.europa.eu>.

Popoff M.Y., Bockemuhl J., Gheesling L.L. (2003) supplement 2001 (no 45) to the Kauffmann-White Scheme. *Research in Microbiology*, 154: 173-174.

Rostagno MH, Hurd HS, McKean JD, Ziemer CJ, Gailey JK, Leite RC. (2003) "Preslaughter holding environment in pork plants is highly contaminated with Salmonella enterica". *Applied and Environmental Microbiology*, 69(8):4489-94.

Smid JH, van Hoek AH, Aarts HJ, Havelaar AH, Heres L, de Jonge R, Pielaat A. (2014). "Quantifying the sources of Salmonella on dressed carcasses of pigs based on serovar distribution." *Meat Science - Journal* 96(4):1425-31

van Hoek AH, de Jonge R, van Overbeek WM, Bouw E, Pielaat A, Smid JH, Malorny B, Junker E, Löfström C, Pedersen K, Aarts HJ, Heres L. (2012) "A quantitative approach towards a better understanding of the dynamics of Salmonella spp. in a pork slaughter-line". *International Journal of Food Microbiology*, 153(1-2):45-52