

# PRESENZA DI *Listeria monocytogenes* IN BOVINI REGOLARMENTE MACELLATI: DATI PRELIMINARI

## ***PRESENCE OF Listeria monocytogenes IN HEALTHY CATTLE AT SLAUGHTERING: FIRST RESULTS***

Colavita G.<sup>1</sup>, Vercellotti L.<sup>2</sup>, Pavoletti E.<sup>2</sup>, Chiesa F.<sup>2</sup>, De Palma D.<sup>3</sup>, Poggiana B.<sup>3</sup>, Miotello Fantoni F.<sup>3</sup>, Miotti-Scapin R.<sup>4</sup>, Radu I.<sup>4</sup>, Giaccone V.<sup>4</sup>

(<sup>1</sup>) DISTAAM – Università del Molise, Campobasso;

(<sup>2</sup>) Servizio Veterinario ASL VC, Vercelli;

(<sup>3</sup>) Azienda U.I.S.S.15 Alta Padovana;

(<sup>4</sup>) Dipartimento di Sanità Pubblica, Patologia Comparata e Igiene Veterinaria, Università di Padova.

### **SUMMARY**

*Listeria monocytogenes* is an ubiquitous pathogen occasionally present in the intestinal tract of various animal species. The aim of this study was to assess the incidence of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* in faeces of healthy cattle at slaughtering. *Listeria* spp. was isolated in 18 out of 220 (8.2%) faecal samples, and *Listeria monocytogenes* was isolated in 3 faecal samples (1.4%). From the 220 faecal samples were also isolated 9 strains of *L. grayi*, 4 strains of *L. innocua* and 2 strains of *L. ivanovii*. Although limited, our results show that animal faeces can represent a source of *L. monocytogenes* contamination of carcasses in abattoirs and can be a potential hazard to human health.

### **Key words**

*Listeria monocytogenes*, beef cattle carcasses, slaughtering.

### **INTRODUZIONE**

Le carni fresche ed i prodotti carnei ready-to-eat sono una delle principali vie di trasmissione di *Listeria monocytogenes* all'uomo, particolarmente in persone immunocompromesse, ma anche in soggetti immunocompetenti, sebbene con prevalenze e quadri clinici differenti fra loro (1).

Si stima, infatti, che tra i soggetti ipoergici colpiti da listeriosi si può raggiungere una letalità del 30-50%, con quadri neurologici e setticemici. Nelle donne in gravidanza, il batterio può colpire anche il feto in utero, con gravi danni sistemici, possibile morte e conseguente aborto. In Inghilterra e Galles tra il 1996 e il 2000, si sono registrati 221 casi di listeriosi, con ben 78 decessi (2). Tra agosto e settembre 2008, in Canada, in - seguito al consumo di prodotti carnei, si sono avuti 56 casi di listeriosi con 20 morti (3).

Nei soggetti immunocompetenti, la listeriosi assume per lo più un andamento benigno, con sintomi gastroenterici che in genere si esauriscono in pochi giorni, senza gravi complicazioni (1). La quasi totalità dei casi umani è connessa alla catena alimentare (4). Inoltre, data l'ampia diffusione nell'ambiente e la sua frequente presenza negli alimenti destinati al consumo umano, *L. monocytogenes* costituisce uno dei microrganismi patogeni di maggiore interesse per i veterinari igienisti e per gli addetti al controllo dei processi produttivi nelle industrie alimentari.

Vari studi condotti in Italia ed in Europa, negli ultimi anni, dimostrano altresì che gli animali da reddito possono essere portatori asintomatici del batterio nel contenuto intestinale; in fase di macellazione il germe può contaminare le carcasse e da lì discendere lungo la filiera produttiva, arrivando alle carni fresche sezionate e macinate e anche ai

prodotti di salumeria, fino al consumatore (1, 5, 6, 7, 8, 9). Così, ad esempio, in Belgio *L. monocytogenes* è stata isolata nel 42,1% di prodotti carnei ready-to-eat. Per lo più la carica riscontrata era bassa (<10 ufc/g), ma nella carne macinata sono state rilevate cariche elevate (>100 ufc/g) (10).

Attualmente non disponiamo di molti dati sulla presenza di *L. monocytogenes* nel contenuto intestinale dei bovini da macello, per cui abbiamo poche informazioni circa il ruolo di questi animali come serbatoio ed eliminatori del microrganismo nell'ambito della filiera delle carni. In letteratura è riportato, inoltre, che i sierotipi di *L. monocytogenes* responsabili di focolai di malattia nell'uomo corrispondono a quelli isolati dai bovini (11).

In Italia si consumano sia carni di bovino adulto che di vitello, per cui è importante acquisire dati sulla prevalenza del patogeno fra i bovini delle varie categorie di età (vitelli, vitelloni, vacche da riforma) sia autoctoni, che importati.

Inoltre, le modalità di allevamento ed alimentazione possono influire sulla prevalenza dei portatori asintomatici di batteri patogeni, come è stato già dimostrato per *Salmonella* spp. e per i ceppi verocitotossici di *Escherichia coli*, mentre non abbiamo altrettanti dati specifici per *L. monocytogenes* (12).

Gli insilati costituiscono una delle principali fonti di contaminazione per gli animali in allevamento, soprattutto nel caso in cui siano di cattiva qualità (pH >5) (13).

Per quanto riguarda la prevalenza di *L. monocytogenes* nelle feci dei bovini avviati al macello, i dati della letteratura scientifica sono molto scarsi. Negli Stati Uniti, su un totale di 323 capi bovini esaminati, si è stimata una prevalenza di portatori asintomatici pari al 29,4% (11). Una prevalenza inferiore è stata riscontrata nei bovini macellati in Irlanda del Nord: 10 portatori sani su 220 bovini testati (4,8%) (14). In Svezia, su 102 campioni di feci di bovini clinicamente sani, *L. monocytogenes* è stata isolata nel 6% dei casi (15). In uno studio condotto in 124 allevamenti bovini da carne, nel nord della Spa-

gna, *L. monocytogenes* è stata riscontrata nel 46,3% degli allevamenti, con una prevalenza del 21,3% di capi positivi (16). L'European Food Safety Authority riporta una prevalenza del 4,6% nelle vacche da latte in Germania (17).

Obiettivo della ricerca è pertanto quello di conoscere quale sia l'incidenza di *L. monocytogenes* nel contenuto intestinale di bovini avviati alla regolare macellazione, per indagare il ruolo che i soggetti portatori asintomatici possono avere nella contaminazione della filiera e fornire, quindi, dati utili per la valutazione del rischio nelle carni bovine.

## MATERIALI E METODI

Il prelievo di feci è stato effettuato direttamente dal colon di vitelli (198-242 gg) e vitelloni/bovini adulti (410-708 gg), appena macellati e provenienti da diverse aziende, in due macelli riconosciuti CE del nord Italia. Complessivamente sono stati esaminati 220 campioni, di cui n.51 da vitelli e 169 da vitelloni/bovini adulti. I campioni sono stati sottoposti ad analisi per la ricerca di *Listeria* spp e *L. monocytogenes*. 10g di campione sono stati omogenizzati in 90ml di Listeria Enrichment Broth Base (FDA-Oxoid). Dopo 24 ore di incubazione a 37°C, 1 ml di brodocoltura è stato inoculato in 10 ml di un secondo brodo di arricchimento, Listeria Enrichment Broth (UVM II-Oxoid), mentre 0,1 ml è stato seminato per spatolamento su piastre di Palcam Agar Base (Oxoid) e di ALOA (Biolife), incubate a 37 °C per 48 ore. Sempre a partire dalla brodocoltura ottenuta da Listeria Enrichment Broth Base (FDA-Oxoid), incubata per ulteriori 24 ore a 37 °C, è stata effettuata una seconda semina per spatolamento di 0,1 ml sempre su Palcam Agar Base e ALOA. Analogamente sono state allestite semine a partire da Listeria Enrichment Broth (UVM II-Oxoid) dopo 24 ore di incubazione a 37 °C.

Le colonie sospette, sono state trapiantate in subcoltura e sottoposte ad identificazione in base ai ca-

Tabella n.1: isolamento di *Listeria monocytogenes* ed altre specie di *Listeria* da campioni fecali di bovini regolarmente macellati.

Categoria animali	N. campioni	<i>Listeria</i> spp	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. grayi</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. ivanovii</i>
Vitelli	51	1	1	0	0	0
Vitelloni/bovini adulti	169	17	2	9	4	2
Totale	220	18	3	9	4	2

ratteri morfologici e tintoriali ed ad identificazione biochimica mediante gallerie API Listeria (bioMérieux).

## RISULTATI

I dati preliminari della ricerca sono riportati nella tabella n.1. Su 220 campioni di feci complessivamente esaminati, *Listeria* spp. è stata isolata in 18 casi (8,2%).

Su 169 vitelloni e bovini adulti, *L. monocytogenes* è stata isolata in 2 soggetti (1,2%) e in 1 dei 51 (2%) vitelli esaminati.

La specie più frequentemente isolata è stata *L. grayi* (4,1%), seguita da *L. innocua* (1,8%), *L. monocytogenes* (1,4 %) e *L. ivanovii* (0,9%).

## CONSIDERAZIONI E CONCLUSIONI

In Italia, questi sono i primi dati sulla prevalenza di *L. monocytogenes* nei bovini regolarmente macellati. I risultati preliminari della ricerca confermano che i bovini da macello possono essere portatori sani di *Listeria* spp. e *L. monocytogenes*. La prevalenza da noi rilevata è doppia rispetto a quella riportata da Kalender (2003), il quale, in bovini macellati in Turchia, ha riscontrato una prevalenza per *Listeria* spp. del 4,6% e per *L. monocytogenes* dello 0,58%.

Esteban e coll. (2008), invece, esaminando 221 campioni fecali di bovini appartenenti a diversi allevamenti spagnoli, hanno rilevato una prevalenza per *L. monocytogenes* molto più alta (21,3%), soprattutto nei bovini da latte. Questa differenza potrebbe essere ricondotta anche al largo utilizzo di insilati nell'alimentazione delle vacche da latte, rispetto ai bovini da carne per i quali, in genere, gli insilati non vengono usati.

Takahashi e coll. (2007), che hanno esaminato 60 bovini da macello, hanno isolato *Listeria* spp. dalla cute di 30 soggetti (50%) e *L. monocytogenes* dalla cute di 3 animali (5%), mentre non hanno rilevato alcuna positività all'esame del contenuto intestinale e delle carcasse.

L'insieme dei dati bibliografici e le prime indicazioni che scaturiscono dalla nostra ricerca, quantunque preliminari e parziali, indicano chiaramente la necessità di approfondire le conoscenze per giungere alla stima della prevalenza dei bovini portatori sani avviati alla macellazione. Essa costituisce indubbiamente un elemento essenziale per sviluppare una corretta Valutazione Quantitativa del Rischio *Listeria monocytogenes* nella filiera produttiva delle

carni fresche e dei prodotti derivati. Il prosieguo della ricerca prevede di ampliare la casistica e di estenderla anche ad altre specie animali da macello come suini e polli. Inoltre, i ceppi di *L. monocytogenes* saranno sottoposti ad ulteriori analisi quali: sierotipizzazione, analisi genomica ed antibiogramma.

## BIBLIOGRAFIA

- 1) Bohaychuck V.M., Gensler G.E., King R.K., Manninen K.I., Sorensen O., Wu J.T., Stiles M.E., McMullen L.M. (2006). Occurrence of pathogens in raw and ready-to-eat meat and poultry products collected from the retail market place in Edmonton, Alberta, Canada. *Journal of Food Protection*, 69, 2176-2182.
- 2) Adak G.K., Meakins S.M., Yip H., Lopman B.A., O'Brien S.J. (2005). Disease risks from foods, England and Wales, 1996-2000. *Emerging Infectious Diseases*, 11, 365-372.
- 3) Anonimus. (2008). Public Health Agency of Canada.
- 4) Mead P.S., Slutsker L., Dietz V., McCaig L.F., Bresee J.S., Shapiro G., Griffin P.M., Tauxe R.V. (1999). Food-related illness and death in the United States. *Emerging Infectious Diseases*, 5, 607-625.
- 5) Fantelli K., Stephan R. (2001). Prevalence and characteristics of Shigatoxin producing *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* strains isolated from minced meat in Switzerland. *International Journal of Food Microbiology*, 70, 63-69.
- 6) Rivera-Betancourt M., Shakleford S.D., Arthur T.M., Westmoreland K.E., Bellinger G., Rossman M., Reagan J.O., Koormaraie M. (2004). Prevalence of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, and Salmonella in two geographically distant commercial beef processing plants in the United States. *Journal of Food Protection*, 67 (2), 295-302.
- 7) Scanga J.A., Grona A.D., Belk K.E., Sofos J.N., Bellinger G.R., Smith G.C. (2000). Microbiological contamination of raw beef trimmings and ground beef. *Meat Science*, 56, 145-152.
- 8) Sheridan J.J., Duffy G., McDowell D.A., Blair I.S. (1994). The occurrence and initial numbers of *Listeria* in Irish meat and fish products and the recovery of injured cells from frozen products. *International Journal of Food Microbiology*, 22, 105-113.
- 9) Sheridan J.J., Duffy G., McDowell D.A., Blair I.S. (1997). Development of a surface adhesion immunofluorescent technique for the rapid isolation of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* from meat. *Journal of Applied Microbiology*, 82, 225-232.
- 10) Van Coillie E., Werbrouck H., Heindrickx M., herman L., Rijpens N. (2004). Prevalence and typing of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat products on the Belgian market. *Journal of Food Protection*, 67 (11), 2480-2487.

- 11) Nightingale K.K., Schukken Y.H., Nightingale C.R., Fortes E.D., Ho A.J., Her Z., Grohn Y.T., McDonough P.L., Wiedmann M. (2004). Ecology and transmission of *Listeria monocytogenes* infecting ruminants and in the farm environment. *Applied of Environmental Microbiology*, 70, 4458-4467.
- 12) Rhoades J.R., Duffy G., Koutsoumanis K. (2008). Prevalence and concentration of verocytotoxigenic *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes* in the beef production chain: A review. *Food Microbiology*, in press.
- 13) Ivanek R., Gröhn Y.T., Wiedmann M. (2006). *Listeria monocytogenes* in multiple habitats and host populations: review of available data for mathematical modeling. *Food-borne Pathogenes and Disease*, 3 (4), 319-335.
- 14) Madden R.H., Murray K.A., Gilmor A. (2006). Carriage of four bacterial pathogens by beef cattle in Northern Ireland at time of slaughter. *Letter of Applied Microbiology*, 44 (2), 115-119.
- 15) Unnertad H., Romell A. Ericsson H., Danielsson-Tham M.L., Tham W. (2000). *Listeria monocytogenes* in faeces from clinically healthy dairy cows in Sweden. *Acta Veterinaria Scandinava*, 41 (2), 167-171.
- 16) Esteban J., Oporto B., Aduriz G., Juste R., Hurtado A. (2008). Faecal prevalence and strain diversity of *Listeria monocytogenes* in healthy cattle, sheep and swine herds in northern Spain. 18th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Barcelona, 19-22 April.
- 17) Anonimus. (2006). The community summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents, antimicrobial resistance and food-borne outbreaks in the European Union in 2005. *EFSA Journal*, 94, 3-288.
- 18) Kalender H. (2003). Detection of *Listeria monocytogenes* in faeces from chickens, sheep and cattle in Ealizig province. *Turk Journal Animal Science*, 27, 449-451.
- 19) Takahashi T., Ochiai Y., Matsudate H., Hasegawua K., Segawa T., Fukuda M., Hondo R., Ueda F. (2007). Isolation of *Listeria monocytogenes* from the skin of slaughtered beef cattle. *Journal of Veterinary Medical Science*, 69 (10), 1077-1079.