

# **PREVALENZA DEI PORTATORI ASINTOMATICI DI *LISTERIA MONOCYTOGENES* NEI POLLI REGOLARMENTE MACELLATI, VALUTAZIONE DELL'ANTIBIOTICORESISTENZA DEI CEPPI ISOLATI: RISULTATI PRELIMINARI**

Fiorentini L.<sup>1</sup>, Lilliu E.<sup>1</sup>, Tosi G.<sup>1</sup>, Taddei R.<sup>1</sup>, Lontani B.<sup>2</sup>, Gaspari P.<sup>2</sup>, Massi P.<sup>1</sup>

*1-Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia ed Emilia Romagna  
sezione diagnostica di Forlì*

*2- Azienda unità sanitaria locale di Cesena, dipartimento di sanità pubblica, U.O.  
igiene alimenti di origine animale*

## **Summary**

In order to study the prevalence of the enteric infection of *Listeria* spp. in broiler chickens a study was carried out in a slaughterhouse during 2011. The study was performed on 50 flocks. The overall prevalence of the enteric *Listeria* spp. infection was 82% of the tested flocks. The prevalence of the *Listeria monocytogenes* infection was 6% of the tested flocks. In the second part of the study the *in-vitro* susceptibility of the isolated strains to 15 antibiotics was carried out.

All isolated strains of *L. innocua*, *L. welshimeri* and *L. monocytogenes* were fully susceptible to amoxicillin, doxycycline, tetracycline, neomycin and colistin and to lincomycin/spectinomycin and trimethoprim/sulphonamides combinations. 3 of 28 *L. innocua* isolated strains and 1 of 3 *L. monocytogenes* isolated strains were resistant to oxacillin. The antimicrobial susceptibility of the *L. grayi* isolated strains and of the *L. ivanovii* isolated strains showed a considerable variability and a resistance to the most tested antibiotics.

## **INTRODUZIONE**

La direttiva 2003/99/CE prevede la raccolta di dati rilevanti e confrontabili su zoonosi, agenti zoonotici, antibiotico-resistenza e casi di tossinfezione alimentare. Sulla base di alcuni studi epidemiologici (European Food Safety Authority – EFSA-2005, 2006, 2007) i dati relativi al livello di contaminazione degli alimenti da *Listeria monocytogenes* oscillano tra 0-48% in prodotti a base di carne e tra 0-40% in prodotti a base di carne di origine avicola (9). Il rapporto EFSA 2008 segnala, rispetto al 2007, un calo del 11% dei casi di infezione da *Listeria* spp. con 1381 casi confermati. Anche se meno frequenti nell'uomo rispetto a *Campylobacter* e *Salmonella*, *Listeria* è nota per causare un alto tasso di mortalità, che colpisce in particolar modo i gruppi vulnerabili come gli anziani. Per quanto riguarda gli alimenti, per la *Listeria* vengono riscontrati livelli superiori ai limiti di sicurezza previsti per legge in alcuni alimenti pronti al consumo, soprattutto nel pesce affumicato, nei prodotti a base di carne sottoposti a trattamento termico e nei formaggi (4,11).

Sono pochi i dati pubblicati sulla prevalenza dell'infezione nelle specie avicole. Com'è noto i casi di listeriosi aviare (intesa come malattia clinicamente manifesta) sono estremamente rari. Tuttavia le specie avicole possono fungere da portatori asintomatici di *Listeria* spp. a livello intestinale e rappresentare una fonte di contaminazione delle carcasse e degli ambienti di lavorazione durante il processo di macellazione (5). Il primo scopo di questo studio è la valutazione della prevalenza

dell'infezione intestinale da *Listeria* spp. nel pollo da carne. Lo studio si prefigge inoltre la valutazione *in vitro* della sensibilità agli antibiotici dei ceppi batterici isolati, includendo quelle classi farmaceutiche utilizzate come terapia d'elezione per la listeriosi umana.

L'area d'indagine è rappresentata da popolazioni di broiler macellati in Emilia Romagna.

## **Materiali e metodi**

### *Campionamento*

I prelievi venivano effettuati in un macello avicolo industriale dell'Emilia Romagna dove annualmente vengono macellati 33.000.000 di polli e 6.000.000 di tacchini in filiera integrata. Si tratta di un macello completamente automatizzato. Il sistema di stordimento delle carcasse è a gas (CO<sub>2</sub>) ed il sistema di eviscerazione è meccanico. Le carcasse, previa eviscerazione, seguono il processo di sezionamento fino al prodotto finito (carni fresche, preparazioni e prodotti a base di carne).

Lo studio veniva condotto nel 2011 per complessivi 11 mesi di attività. Il numero totale di campioni era costituito da 50 lotti (Lotto = partita di polli da carne allevati nello stesso gruppo e condotti al macello lo stesso giorno). Le partite da campionare, definite nella "fase pilota" del progetto, provenivano da 13 diverse province distribuite su tutto il territorio nazionale. Ogni lotto veniva prelevato in sala di eviscerazione ed era costituito da 10 soggetti scelti casualmente. Da ciascuno di essi venivano prelevati i ciechi integri che venivano immediatamente trasferiti in contenitori sterili e in condizioni di refrigerazione.

### *Prove microbiologiche*

Da ciascun intestino venivano prelevati 25 g di contenuto cecale. I campioni venivano sottoposti ad analisi per la ricerca di *Listeria* spp. e *Listeria monocytogenes* secondo la metodica ISO 11290-1 (6,8,10) che prevede le fasi seguenti:

- primo arricchimento in brodo selettivo Half Fraser inoculato con il campione in esame
- secondo arricchimento in brodo selettivo Fraser
- Isolamento in terreni solidi selettivi Agar *Listeria* Ottaviani e Agosti (ALOA) e Oxford agar
- selezione e trapianto delle colonie sospette
- identificazione microbiologica e biochimica delle colonie trapiantate

### *Valutazione della sensibilità agli antibiotici*

Venivano condotte prove *in vitro* di sensibilità agli antibiotici dei ceppi isolati attraverso la tecnica della Minima Concentrazione Inibente (MIC) (1). Per la prova veniva impiegato un sistema standardizzato MIC AVIPRO PLATE<sup>®</sup> progettato per la medicina veterinaria ed in particolare, per la patologia aviaria, costituito da pannelli (piastre microtiter a 96 pozzetti) contenenti 1µg di diversi antibiotici disidratati impiegati in campo umano e veterinario (15 molecole), progettato per determinare la minima concentrazione inibente nei confronti di batteri gram positivi e gram negativi. Per la definizione della sensibilità nei confronti di penicilline, amoxicillina e dell'associazione trimethoprin/sulfametossazolo venivano considerati i breakpoints forniti dal Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI). Negli altri

casi, non avendo a disposizione valori-soglia predefiniti per *Listeria monocytogenes*, venivano considerati i criteri definiti dal CLSI per gli stafilococchi coagulasi positivi (2-3). A tale scopo, veniva considerato come controllo un ceppo di referenza di *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). (7)

Veniva allestito un inoculo per ciascuno dei ceppi in esame di *Listeria Spp.* a partire da un'emulsione batterica in 3 ml di acqua distillata con torbidità standard McFarland al solfato di bario 0.5. In seguito la metodica prevedeva le fasi seguenti:

- Centrifugazione della sospensione per 2-3 secondi.
- Inoculazione di 100 µl di sospensione standardizzata in 11 ml di Mueller Hinton Broth.
- Inoculazione di tutti i pozzetti del pannello MIC AVIPRO PLATE® con 100 µl di sospensione batterica per pozzetto.
- Incubazione per 18-24 ore a 37°C in aerobiosi.
- Lettura dei risultati: la MIC veniva calcolata in base all'ultimo pozzetto che mostrava inibizione della crescita. In caso di crescita batterica in tutte le concentrazioni di antibiotico le MIC venivano definite come maggiori-uguali ( $\geq$ ) rispetto alla concentrazione più alta. Quando non si verificava crescita batterica in tutte le concentrazioni, le MIC venivano registrate come minori o uguali ( $\leq$ ) rispetto alla concentrazione più bassa.

#### *Elenco degli antibiotici*

- |                            |                                 |
|----------------------------|---------------------------------|
| • Amoxicillina             | • Oxacillina                    |
| • Colistina                | • Penicillina G                 |
| • Doxiciiclina             | • Tetraciclina                  |
| • Enrofloxacin             | • Tiamulina                     |
| • Eritromicina             | • Tilmicosina                   |
| • Lincomicina              | • Tilosina                      |
| • Lincomicina/Spectinomina | • Trimethoprim/sulfametossazolo |
| • Neomicina                |                                 |

### **Risultati**

#### *Studio di prevalenza*

Su 500 campioni di feci analizzate, il 71% risultava negativo, la restante percentuale (29%), risultava positiva per *Listeria* così distribuita: (Grafico 1.)

*L. innocua* 24,2%

*L. grayi* 3,2%

*L. monocytogenes* 1%

*L. welshimeri* 1%

*L. ivanovii* 0,2%

Su 50 lotti analizzati, 41 di essi (pari all' 82%) risultavano positivi per *Listeria Spp*; di questi solo 3 lotti (pari al 6%) risultavano positivi per *Listeria monocytogenes*.

Appare significativo il dato di isolamento in 38 lotti (pari al 76%) di altre specie di *Listeria spp.* così ripartite: (Grafico 2.)

*L. innocua* 56% dei lotti positivi

*L. grayi* 16% dei lotti positivi  
*L. welshimeri* 2% dei lotti positivi  
*L. ivanovii* 2% dei lotti positivi

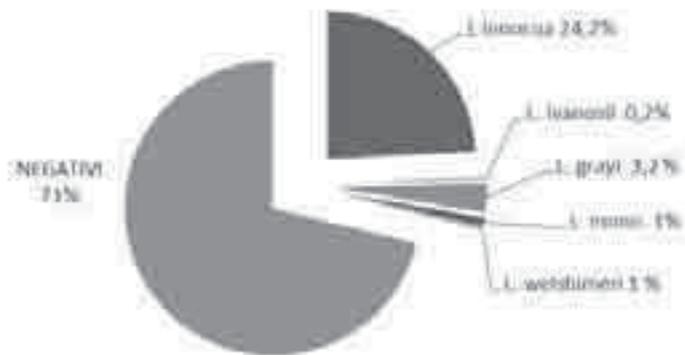


Grafico 1. Distribuzione della Listeria sul totale dei campioni analizzati (500 campioni)

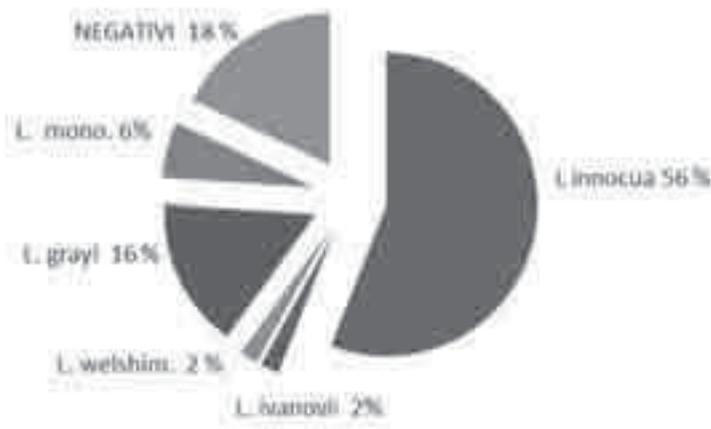


Grafico 2. Distribuzione della Listeria sul totale dei lotti analizzati (50 lotti)

#### Studio di antibioticoresistenza

Lo studio condotto sull'antibioticoresistenza tramite MIC consentiva di osservare una costanza di risultati per tutti i ceppi di *L. innocua*; dati sovrapponibili sono stati ottenuti anche per *L. welshimeri* e *L. monocytogenes*. In particolare tutti i ceppi mostravano completa sensibilità ai seguenti principi attivi: Amoxicillina, Doxiciclina, Tetraciclina, Neomicina, Colistina, Lincomicina/Spectinomomicina e Sulfamidico/trimethoprim. Tutti i ceppi risultavano resistenti a Tilosina, Tilmicosina e Tiamulina. Una maggiore variabilità nella sensibilità agli antibiotici si osservava per la molecola Oxacillina ( $\beta$ lattamico) nei confronti della quale 3 su 28 ceppi di *L. innocua* ed 1 su 3 di *L. monocytogenes* risultavano resistenti.

I dati di MIC ottenuti per *L. grayi* (8 ceppi) e *L. ivanovii* (1 ceppo) risultano estremamente variabili in termini di prestazioni, con caratteristiche di spiccata resistenza nei confronti della maggior parte dei principi attivi impiegati. In particolare due ceppi di *L. grayi* e l'unico ceppo di *L. ivanovii* risultavano resistenti a tutti i  $\beta$ lattamici e all'associazione sulfamidico/trimethoprim. Uno dei ceppi di *L. grayi* resistente ai  $\beta$ lattamici e la stessa *L. ivanovii* risultavano resistenti anche alla tetraciclina.

Tabella 1. Elenco antibiotici e range di distribuzione

MIC	
PRINCIPIO ATTIVO	RANGE ( $\mu$ g/ml)
Penicillina G	0.125-2
Amoxicillina	2-16
Enrofloxacin	0.25-2
Doxiciclina	2-8
Tilosina	0.5-2
Tetraciclina	2-8
Tilmicosina	8-16
Neomicina	8-16
Lincomicina/spectinomycin	8/32 (unica conc.)
Sulfamidico/trimethoprim	0.5/9.5-2/38
Oxacillina	0.25-2
Colistina	2-4
Eritromicina	0.25-4
Tiamulina	8-16
Lincomicina	1-4

Tabella 2. Distribuzione dei risultati *Listeria innocua*

LISTERIA INNOCUA			
N. totale di ceppi analizzati			
28			
	Numero di ceppi		
	R	I	S
Penicillina G	0	0	28
Amoxicillina	0	0	28
Enrofloxacin	0	0	28
Doxiciclina	0	0	28
Tilosina	28	0	0
Tetraciclina	0	0	28
Tilmicosina	28	0	0
Neomicina	0	0	28
Lincomicina/spectinomycin	0	0	28
Sulfamidico/trimethoprim	0	0	28
Oxacillina	3	0	25
Colistina	28	0	0
Eritromicina	0	0	28
Tiamulina	28	0	0
Lincomicina	2	2	24

Tabella 3. Distribuzione dei risultati *Listeria grayi*

**LISTERIA GRAYI**

N. totale di ceppi analizzati

8

	Numero di ceppi		
	R	I	S
Penicillina G	1	2	5
Amoxicillina	0	0	8
Enrofloxacina	1	1	6
Doxiciclina	1	0	7
Tilosina	8	0	0
Tetraciclina	1	0	7
Tilmicosina	8	0	0
Neomicina	2	0	6
Lincomicina/spectinomina	1	0	7
Sulfamidico/trimethoprim	2	0	6
Oxacillina	2	0	6
Colistina	8	0	0
Eritromicina	1	0	7
Tiamulina	8	0	0
Lincomicina	1	0	7

Tabella 4. Distribuzione dei risultati *Listeria welshimeri*

**LISTERIA WELSHIMERI**

N. totale di ceppi analizzati

1

	Numero di ceppi		
	R	I	S
Penicillina G	0	0	1
Amoxicillina	0	0	1
Enrofloxacina	0	0	1
Doxiciclina	0	0	1
Tilosina	1	0	0
Tetraciclina	0	0	1
Tilmicosina	1	0	0
Neomicina	0	0	1
Lincomicina/spectinomina	0	0	1
Sulfamidico/trimethoprim	0	0	1
Oxacillina	0	0	1
Colistina	1	0	0
Eritromicina	0	0	1
Tiamulina	1	0	0
Lincomicina	0	1	0

Tabella 5. Distribuzione dei risultati *Listeria ivanovii*

<b>LISTERIA IVANOVII</b>			
N. totale di ceppi analizzati			
1			
		Numero di ceppi	
	R	I	S
Penicillina G	1	0	0
Amoxicillina	0	1	0
Enrofloxacina	1	0	0
Doxiciclina	1	0	0
Tilosina	1	0	0
Tetraciclina	1	0	0
Tilmicosina	1	0	0
Neomicina	0	0	1
Lincomicina/spectinomicina	0	0	1
Sulfamidico/trimethoprim	1	0	0
Oxacillina	1	0	0
Colistina	1	0	0
Eritromicina	0	0	0
Tiamulina	0	0	0
Lincomicina	0	0	1

Tabella 6. Distribuzione dei risultati *Listeria monocytogenes*

<b>LISTERIA MONOCYTOGENES</b>			
N. totale di ceppi analizzati			
3			
		Numero di ceppi	
	R	I	S
Penicillina G	0	0	3
Amoxicillina	0	0	3
Enrofloxacina	0	0	3
Doxiciclina	0	0	3
Tilosina	3	0	0
Tetraciclina	0	0	3
Tilmicosina	3	0	0
Neomicina	0	0	3
Lincomicina/spectinomicina	0	0	3
Sulfamidico/trimethoprim	0	0	3
Oxacillina	1	0	2
Colistina	3	0	0
Eritromicina	0	0	3
Tiamulina	3	0	0
Lincomicina	0	0	3

### Conclusioni

Dallo studio, condotto su 500 carcasse prelevate casualmente provenienti da 50 partite (distribuite su 13 province del territorio nazionale), appare bassa la contaminazione da *Listeria monocytogenes* nelle feci di pollo al macello. La causa di contaminazione della matrice “carne” ed in particolare delle carni avicole oggetto dello studio va quindi sempre più ricercata negli ambienti di lavorazione degli alimenti che diventano *in primis* una fonte di contaminazione per gli stessi alimenti durante la loro lavorazione. Tale fenomeno è sicuramente enfatizzato dalla capacità intrinseca della *Listeria* spp. di crescere e sopravvivere durante i processi di lavorazione, stoccaggio e distribuzione.

Questo studio quindi, a differenza di quanto avviene per *Salmonella* spp. e *Campylobacter* spp., sembra escludere le carni avicole e le feci di pollo come potenziali fonti di contaminazione diretta di *Listeria monocytogenes* della carcassa lungo la filiera produttiva.

Non appare altrettanto incoraggiante il dato relativo all'alta prevalenza di isolamento dalle feci di pollo di altre specie di *Listeria* (*L.innocua*, *L. ivanovii*, *L. grayi* e *L. welshimeri*) considerate non responsabili di malattia alimentare. L'affermazione deriva dal fatto che molti dati bibliografici dimostrano come batteri patogeni possano acquisire resistenza agli antibiotici da altri batteri saprofiti e commensali, privi di pericolosità diretta, ma possibili serbatoi di geni di resistenza agli antibiotici (12). Per questo motivo lo studio condotto per valutare il grado di sensibilità agli antibiotici, veniva esteso a tutti i ceppi di *Listeria* spp. La scelta del sistema standardizzato di MIC impiegato, era giustificata dal fatto che tra le 15 diverse concentrazioni di antibiotici, erano incluse quelle classi farmacologiche utilizzate come terapia d'elezione della listeriosi: antibiotici  $\beta$ lattamici (penicillina G o ampicillina) eventualmente associati, nei pazienti immunocompromessi, ad un aminoglicoside (come la gentamicina); nei pazienti allergici ai  $\beta$ lattamici, il trattamento di seconda scelta è costituito dall'associazione tra il trimethoprim ed un sulfonamide (quale ad esempio il sulfametossazolo) (9). Lo studio sull'antibioticoresistenza metteva in evidenza una significativa resistenza ai  $\beta$ lattamici in diversi ceppi di *Listeria* spp., dato non trascurabile in virtù del fatto che tale classe farmaceutica rappresenta la prima scelta terapeutica per la listeriosi in campo umano. Lo stesso può essere messo in evidenza per l'associazione sulfamidico/trimethoprim e per la tetraciclina, in particolare nei confronti di *L. grayi* e *L. ivanovii*. I dati ottenuti offrono quindi notevoli spunti riflessione e approfondimento in particolare su quei batteri considerati saprofiti, ubiquitari e banali contaminanti delle derrate alimentari, non direttamente patogeni per l'uomo ma che potrebbero veicolare con i propri geni caratteristiche di antibioticoresistenza a microrganismi patogeni.

## Riferimenti normativi

- Decreto legislativo del governo n.155 del 26 maggio 1997 – Attuazione delle direttive 93/43/3/CEE e 96/3/CEE concernenti l'igiene dei prodotti alimentari.
- Regolamento CE n 178/2002 del parlamento europeo e del consiglio del 28 gennaio 2002, che stabilisce i principi e i requisiti generali della legislazione alimentare, istituisce l'Autorità europea per la sicurezza alimentare e fissa procedure nel campo della sicurezza alimentare.
- Regolamento CE n. 2160/2003 del parlamento europeo e del consiglio del 17 novembre 2003 sul controllo della Salmonella e di altri agenti zoonotici specifici presenti negli alimenti
- Regolamento CE n.852/2004 del parlamento europeo e del consiglio del 29 aprile 2004, sull'igiene dei prodotti alimentari.
- Regolamento CE n.853/2004 del parlamento europeo e del consiglio del 29 aprile 2004, che stabilisce norme specifiche in materia di igiene per gli alimenti di origine animale.
- Regolamento CE n.2073/2005 della commissione del 15 novembre 2005, sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari.
- Decreto legislativo del governo n.193 del 6 novembre 2007 – Attuazione

della direttiva 2004/41/CE relativa ai controlli della sicurezza alimentare e applicazione dei regolamenti comunitari nel medesimo settore.

- Regolamento CE n.1441/2007 della commissione del 5 dicembre 2007, che modifica il regolamento CE n.2073/2005.

## **Bibliografia**

- 1) Andrews J.M. (2001). Determination of minimum inhibitory concentration; Journal Of Antimicrobial Chemotherapy 48, Suppl. S1, 5-16  
antibiotic resistance in *Listeria* species”. Journal of Infectious Diseases 172, 277-281
- 2) Clinical and Elaboratory Standard Institute (CLSI) 2006a. Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria; Approved guideline (M45-A, Vol. 26 No. 19). CLSI, Wayne, PA.
- 3) Clinical and Elaboratory Standard Institute (CLSI) 2006b. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Sixteenth Informational Supplement. (M100-S16, Vol 26 No 3). CLSI, Wayne, PA.
- 4) Charpentier E., Gerbaud G., Jacquet C., Rocourt J., Courvalin P. (1995). “Incidence of antibiotic resistance in *Listeria* species. Journal of Infectious Diseases 172, 277-281
- 5) Gudbjornsdottir B., Suihko M.L., Gustavsson P., Thorkelsson G., Salo S., Sjoberg A-M., Niclasen O., Bredholt S.(2004). The incidence of *Listeria monocytogenes* in meat, poultry and seafood plants in the Nordic countries. Food Microbiology, 21, 217-225.
- 6) ISO 11290-1:1996 “Microbiology of food and animal feeding stuffs- Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes*- Part 1: Detection method
- 7) National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) (2004). Performance Standard for Antimicrobial Susceptibility Testing. Waiane, PA
- 8) O.I.E. : “Manual of Standards for Diagnostic Tests And Vaccines” – fifth edition- 2004
- 9) Request for updating the former SCVPH opinion on *Listeria monocytogenes* risk related to ready-to-eat foods and scientific advice on different levels of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods and the related risk for human illness. Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards. The EFSA Journal (2007) 599, 16-42
- 10) The American Association of Avian Pathologists: “A laboratory Manual For The Isolation and Identification of Avian Pathogens” – third edition- 1989
- 11) The Community Summary Report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in the European Union in 2008. Report of European Food Safety Authority (EFSA) 2008
- 12) Troxler R., Von Graevenitz A., Funke G., Wiedemann B., Stock I., 2000. Natural antibiotic susceptibility of *Listeria* species : *L. grayi*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. monocytogenes*, *L. seeligeri* and *L. welshimeri* strains. *Clinical Microbiology and Infection* 6, 525-535.

***Il presente lavoro è stato sviluppato nell’ambito della ricerca IZSLER co-finanziata dal Ministero della Salute con i contributi del 5 per mille destinati all’attività di ricerca sanitaria***