

RISCONTRI BATTERIOLOGICI IN *Fasciola hepatica* E RASCHIATI DUTTALI DI FEGATI BOVINI

BACTERIOLOGICAL INVESTIGATION ON *Fasciola hepatica* AND CATTLE BILIARY DUCTS

Bucca M., Ziino G., Panebianco A.

Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria, Facoltà di Medicina Veterinaria - Messina

SUMMARY

The aim of this work was to investigate the occurrence of bacteria in *Fasciola hepatica* and into cattle biliary ducts containing the parasite. A total of 24 liver and 58 *F. hepatica* samples were analysed. In all biliary ducts and in 62,06% of parasite *Enterobacteriaceae* were isolated. The bacterial specie more frequently isolated from parasite were *Citrobacter freundii* (34%), *Proteus mirabilis* (18%), *Providencia rettgeri* (12%), *Staphylococcus* spp. (18%), *Enterobacter* spp. (12%). There doesn't appear to be a correlation between bacterial specie from parasite and ducts. The Authors conclude with some related inspective consideration.

Key words

Fasciola hepatica, fluke, bacteria, parasite, interaction, cattle, food inspection.

INTRODUZIONE

Le gravi idatidiosi epatiche così come le gravi distomatosi sono da tempo considerate condizioni favorevoli all'insorgenza di batteriemie negli animali.

Segnatamente, nel caso della fasciolosi bovina, i contenuti della problematica possono essere riassunti in tre aspetti fondamentali: i) la presenza di batteri nei parassiti; ii) le relazioni tra parassita e sistema immunitario dell'ospite; iii) le conseguenti interazioni tra batteri, parassiti e costituenti tissutali del fegato e della cistifellea.

Per quanto concerne il primo punto, *Fasciola hepatica* può spesso albergare batteri sulla cuticola o all'interno del corpo a motivo del suo stesso ciclo biologico che prevede una più o meno lunga permanenza nell'ambiente esterno, la migrazione in seno ai tessuti di gasteropodi terrestri, il passaggio attraverso l'intestino dell'ospite definitivo e la succes-

siva migrazione e localizzazione nel parenchima epatico.

Ciò, fermo restando che i diversi batteri possono, ovviamente, avere diversa capacità adesiva alla cuticola parassitaria e che quest'ultima può essere più o meno "disponibile" al riguardo come prospettato, nello specifico, da El Zawawy et al. (2002) (5) che accertano la maggior capacità adesiva di *Salmonella Typhimurium* su *F. gigantica* rispetto a *Trichinella spiralis*.

In merito ai rapporti tra sistema immunitario dell'ospite e distomi, ricordiamo che alla fasciolosi, in effetti, viene riconosciuta attività immunosoppressiva a motivo della maggiore persistenza del microorganismo in tessuti e feci di bovini e ratti distomatosi sperimentamente infettati rispetto ad animali controllo (1, 2); così come della diminuzione del numero di cellule somatiche nel latte di bovini parassitati (11). Ed ancora, in quanto osservazioni spe-

rimentali su topi dimostrano che *F. hepatica* deprime la risposta dei linfociti Th1 potendosi riconoscere alla malattia indotta un generale effetto immunomodulatore (3).

Tutto ciò induce a ritenere che la parassitosi possa giocare un importante ruolo nella comparsa di salmonellosi bovina (10, 12).

Molto complesse e interessanti sono pure le interazioni parassita-batteri-tessuti come si evince dagli studi di Foster (1984) (7) che, in ratti infestati da *F. hepatica*, riscontra una notevole moltiplicazione dei germi normalmente presenti a livello biliare che addebita alle modificazioni dell'ambiente biliare indotte dai parassiti.

Al riguardo, ricordiamo che anche nel bovino, le vie biliari possono albergare più o meno stabilmente diversi batteri. Essi provengono prevalentemente dall'intestino anche potendone superare la barriera in condizioni fisiologiche, parafisiologiche o patologiche (agenti stressanti) (10, 15). Se il fatto batteriomico è di modica entità i batteri raggiungono solo il fegato e il suo sistema linfatico se, al contrario, è un evento massivo, potranno distribuirsi attraverso il circolo generale. Di fatto *Salmonella* spp., *E. coli* O157:H7, *Campylobacter jejuni* e *C. coli* ed altri generi ancora sono stati isolati dalla bile e dalle vie biliari di ruminanti sani o affetti da patologie (6, 9, 13, 14) e per alcuni, come ad esempio *C. jejuni*, la bile e la mucina duttale rappresentano addirittura un vero e proprio stimolo chemiotattico (8).

Ricordando che la distomatosi può decorrere in forma acuta negli animali più giovani e più spesso cronica, inducendo flogosi duttale, necrosi ed erosione, ectasie od ostruzioni duttali, iperplasia dell'epitelio biliare, calcificazione ed altro ancora, se ne deduce che una marcata batteriobilia e la possibilità di batteriemia possono essere eventi non remoti, in particolare se si realizza una contemporanea colicistite (3, 4, 16).

I succitati studi e la frequenza della parassitosi ci pare rendano l'argomento di vivo interesse nell'ottica della produzione igienica della carne. Pertanto, abbiamo ritenuto utile contribuire alla casistica effettuando un'indagine batteriologica su esemplari di *F. hepatica* prelevati dal fegato di bovini e sul materiale, mucoso o essudatizio, intraduttale.

MATERIALI E METODI

L'indagine è stata condotta su n. 24 fegati provenienti da bovini regolarmente macellati nella provincia di Messina (nel periodo compreso tra ottobre 2005 e febbraio 2006) e sottoposti a sequestro, se-

condo quanto previsto dalla vigente normativa, per evidenti lesioni parassitarie riferibili a distomatosi. Ogni campione veniva sottoposto all'incisione dei dotti biliari di maggiori dimensioni, dai quali venivano estratti complessivamente n. 161 esemplari di *Fasciola hepatica*.

Dopo ripetuti lavaggi in acqua distillata sterile, si allestivano n. 58 campioni (costituiti da un numero di parassiti compreso tra 1 e 5), processati per la ricerca di:

- Enterobatteri con semine in piastre di VRBA (Oxoid) (37°C per 24 ore);
- Anaerobi solfito riduttori con semine in piastre di SPS agar (37°C per 24-48 ore in condizioni di anaerobiosi);
- Stafilococchi coagulasi positivi con semine in piastre di Baird Parker Medium con Egg Yolk Tellurite emulsion (Oxoid) (37°C per 24 ore);
- *Salmonella*, con un pre-arricchimento in acqua peptonata tamponata (35°C per 18-24 ore); un successivo arricchimento in Rappaport-Vassiliadis Enrichment Broth (Oxoid) (42°C per 24-48 ore) e in Selenite Broth base (Oxoid) (35°C per 18-24 ore) e successive semine in piastre di XLD medium (Oxoid) e Desoxycholate Citrate agar (Oxoid) (37°C per 24 ore);
- *Yersinia enterocolitica*, con arricchimento in brodo ITC (Irganon Ticarcillina Clorato di Potassio) (25°C x 48-72h) e in Tampone Fosfato (4°C per 7-21 gg) da cui si allestivano semine in piastre di Yersinia Selective Agar Base (CIN Medium) (Oxoid) addizionato con Yersinia Selective Supplement (Oxoid) (30°C x 24 ore).

Un cospicuo numero di ceppi isolati dal VRBA nonché tutte le colonie diverse per colore, forma e grandezza cresciute sugli altri terreni venivano prelevate e identificate con le comuni tecniche e con sistema API 20E e API Staph (bioMérieux).

Dai dotti biliari parassitati, inoltre, si allestivano raschiati comprensivi del materiale poltaceo in essi contenuto che venivano processati per le medesime determinazioni batteriologiche. I ceppi positivi per *Salmonella* spp. venivano inviati al Dott. Stefano Bilei, che qui ringraziamo, responsabile del Centro di Riferimento Regionale per gli Enterobatteri Patogeni, presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana, per la conferma e la tipizzazione sierologica.

RISULTATI

Da ciascun fegato era possibile estrarre un numero variabile di parassiti compreso tra 2 e 12. Si

intuisce, dunque, che si trattava di distomatosi non molto gravi e solo in qualcuno di essi si riscontravano quadri periangiocolitici classici con presenza di calcificazione e necrosi.

Enterobatteri sono stati isolati dai raschiati duttali di tutti i fegati e soltanto in 36 dei campioni di parassiti esaminati (62,06%). Nei Grafici 1 e 2 è indicata la prevalenza delle specie rispettivamente identificate.

Salmonella London (3, 10:I, v:1, 6) Gr O:3, 10 (E1) e *Salmonella Anatum* (3, 10: e, h: 1, 6) Gr O:3, 10 (E1) venivano isolate dal raschiato duttale del fegato n. 12, peraltro infestato modicamente. Costantemente negativa la ricerca di *Y. enterocolitica* e di anaerobi solfito riduttori.

Solo in due casi si è accertata corrispondenza degli isolamenti batteriologici da parassiti e materiale duttale, in particolare si trattava rispettivamente di *C. freundii* e *P. mirabilis*.

CONSIDERAZIONI E CONCLUSIONI

Detti risultati non consentono di trarre considerazioni conclusive sull'argomento ma dimostrano che *F. hepatica* alberga spesso numerosi batteri, in prevalenza *Enterobacteriaceae* (62,06%). Viene confermato altresì che i dotti biliari in preda a distomatosi ospitano costantemente batteri tra i quali figurano specie potenzialmente patogene quale *Salmonella*.

La diversa percentuale d'isolamento, non disgiunta dalla rara coesistenza di specie batteriche tra parassiti e dotti, ci pare possa indicare un'origine non sempre comune delle rispettive contaminazioni, probabilmente relazionabile al ciclo biologico del parassita; o, più verosimilmente, alla maggiore possibilità di persistenza batterica nel substrato duttale.

Giustificate, dunque, le preoccupazioni, già ri-

Grafico 1

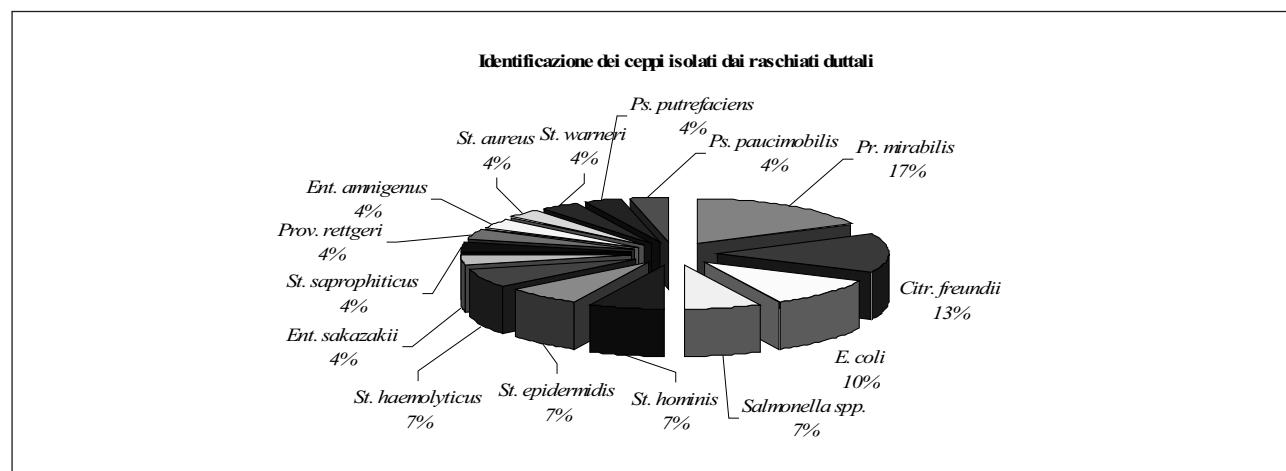
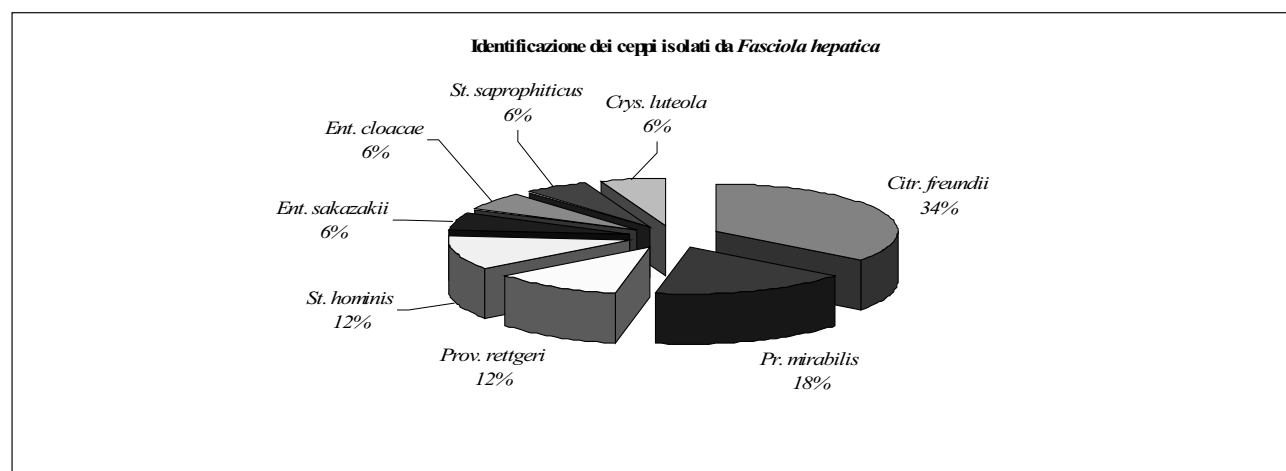


Grafico 2



cordate in premessa, di contaminazione endogena in conseguenza d'infestazioni massive.

Pertanto, in osservanza del Regolamento CE 854/2004, norma questa solo apparentemente "più elastica" rispetto al precedente D.Lvo 286/1994, fermo restando il sequestro totale per i fegati parassitati, ci pare sia necessario in base all'Allegato I, Sezione II, capo 5, verificare laboratoristicamente l'inidoneità della carcassa al consumo umano nei casi d'infestazione massiva laddove si dovessero cogliere macroscopicamente i già ricordati elementi di sospetto.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Aitken M.M., Hughes D. L., Jones P.W. (1980) – Effects of *Fasciola hepatica* infection on responses of rats to reinfection with *Salmonella dublin*. Res Vet Sci., 28, 250-3.
- 2) Aitken M.M., Jones P.W., Hall G.A., Hughes D.L., Brown G.T. (1981) – Responses of fluke-infected and fluke-free cattle to experimental reinfection with *Salmonella dublin*. Res Vet Sci., 31, 120-6.
- 3) Brady M.T., O'Neill S.M., Dalton J.P., Mills K.H.G., (1999) – *Fasciola hepatica* suppresses a protective Th1 response against *Bordetella pertussis*. Infection and Immunity, 67, 5372-8.
- 4) Carpenter H.A., (1998) Bacterial and parasitic cholangitis. Mayo Clin Proc., 73, 473-8.
- 5) El Zawawy L.A., Ali S.M., Mohamed O.N., Allam S.R. (2002) – Bacterial-parasite interaction between *Salmonella* and each *Fasciola gigantica* and *Trichinella spiralis*. J. Egypt. Soc. Parasitol., 32, 745-754.
- 6) Erta H.B., Ozbey G., Kiliç A., Muz A. (2003) - Isolation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from the gall bladder samples of sheep and identification by polymerase chain reaction. J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public Health, 50, 294-7.
- 7) Foster J.R. (1984) Bacterial infection of the common bile duct in chronic fascioliasis in the rat. J. Comp. Pathol., 94, 175-181.
- 8) Hugdahl M.B., Beery J.T., Doyle M.P. (1988) – Chemotactic behavior of *Campylobacter jejuni*. Infect. Immunol., 56, 1560-6.
- 9) Jeong K.C., Kang M.Y., Heimke C., Shere J.A., Erol I., Kaspar C.W. (2007) - Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from the gall bladder of inoculated and naturally-infected cattle. Vet. Microb., 119, 339-345.
- 10) Mantovani G. – Ispezione degli alimenti di origine animale. Unione Tipografica – Editrice Torinese, 1961.
- 11) Michalski M. (2002) – The influence of *Fasciola hepatica* invasion on the assorted milk quality parameters in cows. Wiad Parazytol. 48, 225-9.
- 12) Morisse J.P., Cotte J.P. (1994) – Evaluation of some risks factors in bovine salmonellosis. Vet. Res., 25, 186-191.
- 13) Oboegbulem S.I., Muogbo E.N. (1981) – A survey of *Salmonellae* in trade cattle slaughtered at Nsukka abattoir. Int. J. Zoonoses, 8, 107-110.
- 14) Reinstein S., Fox J.T., Shi X., Nagaraja T.G. (2006) – Prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 in gallbladders of beef cattle. Appl. Environ. Microbiol., 73, 1002-4.
- 15) Romboli B., Mantovani G. – Ispezione e controllo delle derrate di origine animale. UTET, Torino, 1985.
- 16) Valero M.A., Navarro M., Garcia-Bodelon M.A., Marcilla A., Morales M., Hernandez J.L., Mengual P., Mas-Coma S. (2006) – High risk of bacterobilia in advanced experimental chronic fasciolosis. Acta Trop., 100, 17-23.