

Microbiological assessment of freshly-shot wild boars meat in Lazio Region, Viterbo territory: a preliminary study

Eda Maria Flores Rodas,¹
Tatiana Bogdanova,¹ Teresa Bossù,¹
Sabrina Pecchi,¹ Francesco Tomassetti,¹
Paola De Santis,¹ Rita Tolli,¹
Roberto Condoleo,¹ Sara Greco,¹
Alberto Brozzi,¹ Stefano Bilei,¹
Giuseppe Micarelli,² Enrica Martini,²
Massimo Palazzetti²

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana, Roma;

²Azienda Sanitaria Locale 9 - Sezione di Viterbo, Italy

Abstract

During the wild boars hunting season (2012-2013), 6508 adults were shot in Lazio Region, Viterbo territory. Out of the 6508, 393 subjects were sampled to be tested for the detection of *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica*, *E. coli* VTEC and *Trichinella* spp. For this purpose, diaphragm and skeletal muscles samples were collected after the shooting, and tested at the Istituto Zooprofilattico Sperimentale Lazio and Toscana laboratories, Rome, Italy. Samples were tested respectively by polymerase chain reaction, enzyme linked immunofluorescent assay, microbiological and parasitological assays. The positivity percentages are 3.6% for *Salmonella* spp., 14.8% (out of 230 samples tested) for *Yersinia enterocolitica*, 4.6% for *E. coli* VTEC (*vtx* 1 and 2 genes). Each positive sample for *vtx* 1 and 2 was tested to isolate Verotoxigenic *E. coli* strains; none of them was positive for the same virulence genes. All diaphragm samples were negative to the trichinoscopic test. Every bacterial strain was identified serologically by seroagglutination test.

Introduzione

La catena alimentare rappresenta una delle principali vie di trasmissione di zoonosi (Milnes *et al.*, 2008). Durante gli ultimi anni, la popolazione di suidi selvatici è aumentata notevolmente in tutta Europa, probabilmente in relazione all'innalzamento delle temperature ed all'aumento delle fonti di alimento (Geisser e Reyer, 2005). L'aumento della densità della popolazione di cinghiali, unita allo sviluppo di allevamenti semibradi di suini dome-

stici, può rappresentare un fattore di rischio per la trasmissione di microrganismi e parassiti tra le due popolazioni (Gortázar *et al.*, 2006). Quindi, i cinghiali possono rappresentare un reservoir di agenti patogeni per i suini domestici (de Deus *et al.*, 2008).

Salmonella spp., *Yersinia enterocolitica*, Verotoxigenic *E. coli* (VTEC) e *Trichinella* spp. sono patogeni di origine alimentare sono diffusi nei suini domestici e nel loro ambiente e la trasmissione tra animale ed animale avviene principalmente per via oro-fecale (Butzler, 2004). L'uomo si infetta attraverso il consumo di acqua od alimenti contaminati o attraverso lo stretto contatto con animali infetti ma asintomatici. In contrasto con l'abbondante letteratura disponibile sulla presenza dei suddetti patogeni zoonotici nell'uomo e nei suini domestici, si conosce molto poco sulla presenza di questi patogeni nelle popolazioni di suidi selvatici. Per questo motivo ed anche per l'aumento del consumo pro capite di carne di cinghiale, cotta o cruda stagionata, la maggiore conoscenza della circolazione di patogeni zoonotici a trasmissione alimentare sta diventando un argomento di salute pubblica sempre più importante (Wacheck *et al.*, 2010).

Lo scopo del presente studio è stato quello di valutare il grado di diffusione di patogeni a trasmissione alimentare nella popolazione di cinghiali durante gli abbattimenti programmati nel periodo 2012-2013 nel comprensorio di Viterbo.

Materiali e metodi

Raccolta campioni

I campioni sono stati prelevati durante le battute di caccia effettuate nel comprensorio di Viterbo nei periodi dal 6/1/2012 al 30/01/2012, dal 12/11/2012 al 27/11/2012 e dal 5/01/2013 al 17/03/2013, sia come abbattimenti programmati che come abbattimenti per il controllo demografico di popolazione. I soggetti abbattuti e campionati sono stati complessivamente 393, di cui 170 (43,3%) maschi, 215 (54,7%) femmine e 8 (2,0%) soggetti per i quali il sesso non è stato dichiarato nel verbale di prelievo, dai quali sono stati prelevati campioni di muscolo (diaframma e muscolo scheletrico, prevalentemente della coscia) per le ricerche batteriologiche (*Salmonella* spp., *Y. enterocolitica* ed *E. coli* VTEC) e parassitologiche (*Trichinella* spp.). Tutti gli esami sono stati effettuati presso i Laboratori dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana, Roma.

Prove di laboratorio

Analisi microbiologiche

Come metodo di screening per la ricerca di

Correspondence: Eda Maria Flores Rodas, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana, via Appia Nuova 1411, 00178 Roma, Italy.

Tel. +39.06.79099340 - Fax: +39.06.79099330.

E-mail: eda.flores@izslt.it

Key words: Wild boars, Foodborne pathogens, *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica*, *Escherichia coli*.

Conflict of interests: the authors declare no potential conflict of interests.

Received for publication: 13 May 2013.

Revision received: 9 September 2013.

Accepted for publication: 25 September 2013.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution 3.0 License (by-nc 3.0).

©Copyright E.M. Flores Rodas *et al.*, 2014

Licensee PAGEPress, Italy

Italian Journal of Food Safety 2014; 3:1711

doi:10.4081/ijfs.2014.1711

Salmonella spp. è stata utilizzata la procedura VIDAS-SLM. Il metodo VIDAS consiste essenzialmente in un'analisi immuno-enzimatica a fluorescenza effettuata mediante lo strumento VIDAS® bioMérieux (Marcy l'Etoile, Francia). Nel caso di positività dei brodi, è stata eseguita anche la prove colturale secondo la ISO 6579:2002. Le colonie sospette *Salmonella* spp sono state confermate con VITEK® 2 Compact, e successivamente sottoposte a sierotipizzazione. Per la ricerca di *Yersinia enterocolitica* è stata utilizzata la metodica ISO 10273:2003. Le colonie sospette sono state confermate con VITEK2® COMPACT BioMérieux e quindi saggiate in *real time polymerase chain reaction* (PCR) per il rilevamento del gene *ail* che rappresenta un carattere di virulenza. Le stesse colonie sono quindi state sottoposte a sierotipizzazione. Per la ricerca di *E. coli* VTEC è stato utilizzato il protocollo descritto nella ISO/TS 13136. I campioni risultati positivi per la presenza di geni codificanti per i fattori di virulenza (*eae*, *vtx1*, *vtx2*) allo screening in PCR sono stati seminati su appositi terreni in piastra (S-MAC, CT-S-MAC e chromID® BioMérieux) previa immunoseparazione, per O:157 ed O:26, oppure omettendo questo passaggio per tutti gli altri sierogruppi ricercati, a causa della scarsa efficacia dei kit presenti in commercio. Le colonie isolate sono state nuovamente saggiate mediante PCR per la presenza dei geni codificanti per i fattori di virulenza (*eae*, *vtx1*, *vtx2*) e per la definizione del sierogruppo, e quindi sottoposte a sieroagglutinazione rapida su vetrino.

Sierotipizzazione

Tutti i ceppi di *Salmonella* spp isolati sono

stati sottoposti a sieroagglutinazione rapida su vetrino. I sieri utilizzati sono Polivalenti O, H e Vi [Statens Serum Institut (SSI), Copenhagen, Danimarca].

Tutti i ceppi di *Yersinia enterocolitica* isolati sono stati sottoposti a sieroagglutinazione rapida. I sieri utilizzati sono Polyvalent O1-O2 e Group O3, O5, O8 ed O9 (Denka Seiken Co. Ltd., Tokyo, Giappone).

Tutti i ceppi di *E. coli* risultati positivi per almeno 1 fattore di patogenicità *vtx1* o/e *vtx2* sono stati esaminati con il metodo PCR per l'identificazione del sierogruppo. Tutti i ceppi di *E. coli* sono stati sottoposti a sieroagglutinazione rapida su vetrino. I sieri utilizzati sono Pool *E. coli* (SSI) e monovalenti O26, O103, O104, O45, O111, O157, O121.

Ricerca di *Trichinella* spp.

La ricerca di *Trichinella* spp. è stata eseguita secondo la metodica descritta dal Regolamento 2075/2005/CE.

Risultati

Le indagini eseguite hanno dato i seguenti risultati. *Salmonella* spp. è stata rilevata nel 3,6%; i 7 ceppi saggiati sono stati identificati come: 1 ceppo *S. Kottbus*, 2 ceppi *S. Manhattan* e 4 ceppi *S. enterica* subsp. *diarizonae* IIIb.

E. coli VTEC nel 4,6% dei soggetti campionati (*vtx1* e 2 rilevati insieme in 12 campioni, e solo il gene *vtx1* in 6 campioni). I ceppi isolati da 14 dei 18 campioni saggiati, sono risultati appartenenti ai seguenti sierogruppi: 6 campioni O145, 5 campioni O157, 1 campione O104, 1 campione O26 ed 1 campione O103.

Yersinia enterocolitica è stata rilevata nel 14,8% su un totale di 230 campioni sottoposti a tale prova). I 34 ceppi isolati sono stati identificati come 3 appartenenti al sierogruppo O8, 1 al sierogruppo O3, 2 al sierogruppo O5 e 28 ceppi non agglutinanti con i sieri suddetti.

La ricerca di *Trichinella* spp. ha dato esito negativo in tutti i 393 campioni sottoposti a saggio.

Discussione e Conclusioni

La qualità microbiologica della carne di selvaggina abbattuta dipende da diversi fattori: i)

i tipi di microrganismi presenti nel tratto gastroenterico, nei muscoli ed in altre sedi di latenza degli animali; ii) circostanze e modalità di abbattimento; iii) condizioni di sezionamento della carcassa. La microflora che si svilupperà durante la conservazione delle carni sarà correlata alle condizioni di conservazione ed alle caratteristiche biochimiche intrinseche della carne stessa. Sembra esserci una differenza significativa di contaminazione batterica anche a seconda delle zone colpite in fase di caccia. Infatti, contaminazioni maggiori sono state rilevate in quei soggetti uccisi con colpi all'addome piuttosto che in altre parti del corpo, probabilmente per danno intestinale e fuoriuscita di feci (Avagnina *et al.*, 2009). Altro interessante dato scaturito è la differenza nella percentuale di soggetti infetti tra femmine, 29,3% del totale delle femmine, e maschi, 22,4% del totale dei maschi. Tale differenza è stata già riportata da altri Autori (Wacheck *et al.*, 2010) e sembra essere legata al diverso comportamento sociale tra maschi e femmine. Queste ultime, infatti, vivono prevalentemente in un contesto sociale di comunità con altre femmine e cuccioli, mentre i maschi sono prevalentemente solitari. Relativamente al rapporto tra peso dei soggetti abbattuti, parametro utile al fine di classificare le differenti fasce di età, e percentuale di soggetti infetti, dai dati a nostra disposizione risulta che nei soggetti di peso fino a 50 kg la percentuale di infetti è del 37,2%, mentre in quelli di peso superiore ai 50 kg la percentuale si riduce al 29,9%. Ciò è riferito in bibliografia (Wacheck *et al.*, 2010) e sembra essere legato al comportamento sociale dei soggetti più giovani che vivono in comunità rispetto agli adulti spesso solitari (Kranker *et al.*, 2003).

È ormai noto che la fauna selvatica rappresenta una fonte di infezioni di vario tipo per gli animali domestici. I cinghiali, in particolare, sono spesso portatori di agenti di zoonosi a trasmissione alimentare a livello tonsillare, ma non solo (Milnes *et al.*, 2008). I portatori rappresentano, quindi, una fonte di contaminazione delle carcasse. Questo è un aspetto che anche i cacciatori devono tenere ben presente, trovandosi spesso a manipolare carcasse in scarse condizioni igieniche. Ciò può costituire un problema anche a livello domestico, non tanto per il consumo diretto della carne di cinghiale, generalmente ben cotta, ma per il rischio di contaminazioni crociate con altri alimenti che poi non subiranno trattamenti termici o di sanificazione (Milnes *et al.*, 2008). In

generale, il consumo di carne di cinghiale poco cotta è comunque da sconsigliare.

Infine, da non trascurare è anche il possibile contatto tra i cinghiali vivi ed i suini domestici allevati all'esterno e la possibile trasmissione di questi patogeni dai selvatici ai domestici (Wacheck *et al.*, 2010).

Bibliografia

- Avagnina A, Ferroglio E, Grassi MA, Civera T, 2009. Investigazion about microbiological quality of freshly shot game from alpine ungulates. Disponibile al sito: http://www.izsler.it/izs_bs/allegati/718/09SIEF.pdf
- Butzler JP, 2004. Campylobacter, from obscurity to celebrity. Clin Microbiol Infect 10:868-76.
- Deus de N, Peralta B, Pina S, Allepiz A, Mateu E, Vidal D, Ruiz-Fons F, Martín M, Gortázar C, Segalés J, 2008. Epidemiological study of Hepatitis E virus infection in European wild boars (*Sus scrofa*) in Spain. Vet Microbiol 129:163-70.
- Geisser H, Reyer HU, 2005. The influence of food and temperature on population density of wild boar *Sus scrofa* in the Thurgau (Switzerland). J Zool 267:89-96.
- Gortázar C, Acevedo P, Ruiz-Fons F, Vincente J, 2006. Disease risks and overabundance of game species. Eur J Wildlife Res 52:81-7.
- Kranker S, Alban L, Boes J, Dahl J, 2003. Longitudinal study of Salmonella enterica serotype Typhimurium infection in three Danish farrow-to-finish swine herds. J Clin Microbiol 41:2282-8.
- Milnes AS, Steuart I, Clifton-Hadley FA, Davies RH, Newell DG, Sayers AR, Cheasty T, Cassar C, Ridley A, Cook AJC, Evans SJ, Teale CJ, Smith RP, McNally A, Toszeghy M, Futter R, Kay A, Paiba GA, 2008. Intestinal carriage of verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157, *Salmonella*, thermophilic *Campylobacter* and *Yersinia enterocolitica*, in cattle, sheep and pigs at slaughter in Great Britain during 2003. Epidemiol Infect 136:739-51.
- Wacheck S, Fredriksson-Ahomaa M, König M, Stolle A, Stephan R, 2010. Wilde Boars as an important reservoir for foodborne pathogens. Foodborne Pathog Dis 7:307-12.