

INDAGINE SULLA DIFFUSIONE DI *CAMPYLOBACTER* SPP. NEI BROILER MACELLATI
IN EMILIA-ROMAGNA
SURVEY ON *CAMPYLOBACTER* SPP. PREVALENCE IN BROILER CHICKENS
SLAUGHTERED IN EMILIA-ROMAGNA REGION

Rugna G.¹, Merialdi G.¹, Bardasi L.¹, Bassi S.¹, Dell'Anna S.¹, Fontana M.C.¹, Galletti G.¹, Massi P.¹, Santi A.², Tamba M.¹

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna

² Regione Emilia-Romagna, DG Sanità e Politiche Sociali

SUMMARY - Thermophilic *Campylobacter* spp. have been recognised as a major cause of foodborne infections in many countries throughout the world. Poultry meat is the most common source for foodborne cases of human campylobacteriosis. An European *baseline* study (Dec. 516/07/UE) was carried out in the year 2008 with the aim of determining the prevalence of *Campylobacter* spp. in broiler chickens and the contamination level on the broiler carcasses. One hundred broiler flocks were sampled in 4 poultry slaughterhouses in Emilia Romagna and 52% (IC 95%: 41,8%-62,1%) were positive for *Campylobacter jejuni/coli*. The prevalence of thermophilic *Campylobacter* on carcasses was 26,0% (IC 95%: 17,7%-35,7%) and it was correlated to finding of these bacteria in the broilers' gut (O.R.: 3,8; I.C. 95%: 1,4-9,9).

KEY WORDS: *Campylobacter* spp., broiler chickens, carcasses, zoonosis

INTRODUZIONE - La campilobatteriosi rappresenta la più comune zoonosi alimentare di origine batterica in molti Paesi industrializzati. Il numero totale di casi umani nei Paesi dell'Unione Europea nel 2007 è risultato di 200.507, con un tasso di notifica pari a 45,2/100.000 abitanti (5). Le specie più comunemente associate ad infezione nell'uomo sono *C. jejuni*, seguita da *C. coli* e *C. lari* (5). Il periodo di incubazione nell'uomo dura in media dai 2 ai 5 giorni. I pazienti mostrano una sintomatologia caratterizzata da diarrea acquosa, a volte emorragica, dolore addominale, febbre, mal di testa e nausea. Nella maggior parte dei casi la campilobatteriosi è una patologia autolimitante e di breve durata; raramente possono verificarsi infezioni extra-intestinali, alcune delle quali croniche immuno-mediate (endocardite, eritema nodoso, artrite reattiva). *C. jejuni* è riconosciuto come la più frequente causa della sindrome di Guillain-Barré, una forma neurologica post-infettiva, anche letale (1). Da non sottovalutare è il frequente isolamento di ceppi di *Campylobacter* spp. resistenti a chinolonici e fluorochinolonici (11), antibiotici comunemente usati per la terapia di infezioni intestinali nell'uomo.

Le fonti di infezione e i fattori di rischio per l'uomo includono il consumo di latte crudo, di carne, di acqua contaminata, il contatto con animali domestici e i viaggi all'estero; diversi studi caso-controllo hanno però dimostrato che il consumo o la manipolazione di carne di pollo sono responsabili per il 20-40% delle infezioni da *Campylobacter* spp. (3; 7; 13; 15). Poiché *Campylobacter* spp. è poco termo-tollerante, la cottura dei cibi riduce notevolmente il rischio di esposizione, ma non è da sottovalutare la possibilità che una scorretta manipolazione in ambito domestico di carne avicola contaminata possa portare a fenomeni di cross-contaminazione di prodotti che vengono consumati senza necessità di cottura (*Ready to Eat Foods*).

Campylobacter spp. è spesso isolato dalla microflora del piccolo intestino e dei ciechi dei polli ed il contenuto intestinale è ritenuto la principale fonte di contaminazione delle carcasse durante le operazioni di macellazione (8), con conseguente possibile rischio di esposizione per il consumatore finale.

La Direttiva 2003/99/CE prevede che gli Stati Membri raccolgano dati rilevanti e confrontabili circa le zoonosi, gli agenti zoonotici, la resistenza agli antimicrobici e i focolai di infezione alimentare. Nell'ottica di fornire alla Comunità Europea degli strumenti obiettivi ai fini di una valutazione quantitativa del rischio per la messa in atto di misure di contrasto alle gastroenteriti da *Campylobacter* spp., è stato intrapreso uno studio sulla diffusione del microrganismo nella filiera

della carne di pollo. A tal fine è stata emanata la Decisione 516/2007/CE, che definisce gli aspetti tecnici e finanziari inerenti ad uno studio di prevalenza. In questo lavoro vengono riportati i dati preliminari riferiti alle attività svolte in Emilia-Romagna.

MATERIALI E METODI - L'indagine si è svolta nel corso dell'anno 2008. Il campionamento è stato condotto al macello, considerando come unità campionaria elementare il lotto di macellazione (partita di polli da ingrasso, allevati nello stesso gruppo e portati nello stesso giorno a un mattatoio). La Decisione 516/2007/CE ha previsto per l'Italia una dimensione campionaria pari ad almeno 384 lotti di macellazione. Con nota DGSAFV II/15911/P-I 8d/188, all'Emilia Romagna è stato assegnato, in maniera proporzionale al numero di capi macellati per Regione (fonte: ISTAT 2005), un campione costituito da 93 lotti di macellazione.

Il campione secondario, rappresentato dai *broiler* da campionare per ciascun lotto di macellazione, era costituito da 10 soggetti per l'isolamento di *Campylobacter* spp. dall'intestino ed un soggetto per l'individuazione del *Campylobacter* spp. dalle carcasse.

Poiché è dimostrato che la diffusione del microrganismo manifesta una significativa variabilità stagionale, è stata considerata una stratificazione su base temporale, che prevedesse il prelievo di un numero uguale di campioni per ogni mese dell'anno di studio.

Al macello, gli intestini ciechi intatti sono stati raccolti al momento dell'eviscerazione e la carcassa intera è stata prelevata dopo la refrigerazione ma prima di ulteriori trasformazioni.

La ricerca di *Campylobacter* spp. per valutare la prevalenza dell'infezione nei gruppi di broilers è stata eseguita in conformità a quanto previsto nell'allegato 1 della Dec. 516/2007/CE. La ricerca a partire dal contenuto del cieco di 10 soggetti (esaminati *in pool*) è stata eseguita tramite coltura diretta in ambiente selettivo (modified Charcoal Cefoperazione Deoxycolate Agar - mCCD Agar). L'isolamento e la conferma sono state effettuate secondo la norma ISO 10272-1:2006 (9).

La ricerca sulle carcasse è stata fatta analizzando la pelle del collo insieme a quella di un lato della carcassa, in modo da ottenere una porzione rappresentativa di prova (27g) sulla quale effettuare contestualmente la ricerca qualitativa e la numerazione di *Campylobacter* spp. termotolleranti.

Le metodiche di riferimento sono state rispettivamente la ISO 10272-1:2006 (9) e ISO 10272-2 (10).

RISULTATI - In Emilia Romagna sono stati analizzati in tutto 100 lotti di macellazione (10% in più del numero assegnato), eseguendo il campionamento nei 4 principali macelli avicoli presenti sul territorio regionale. 59 lotti di macellazione risultano di origine regionale e 41 di origine extraregionale (Veneto, Lombardia, Marche, Piemonte).

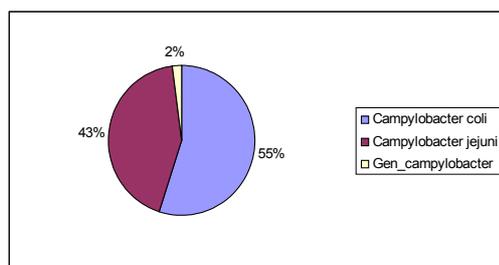


Fig.1. Distribuzione *Campylobacter* spp. isolati da intestino

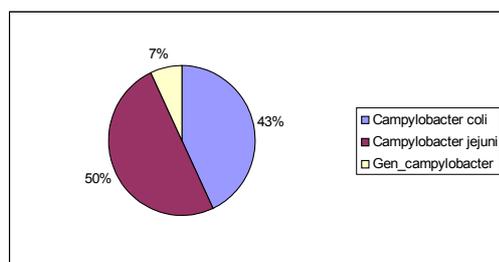


Fig.2. Distribuzione *Campylobacter* spp. isolati da carcasse

Analisi su contenuto ciecale La ricerca di *Campylobacter* spp. termofili in campioni di contenuto ciecale, ha evidenziato positività nel 52% (IC 95%: 41,8%-62,1%) dei lotti testati. Se si considerano i risultati dei soli lotti di macellazione provenienti da allevamenti regionali, la percentuale di positività risulta per l'Emilia-Romagna pari al 61,0% (IC 95%: 47,4%-73,5%). Nella figura 1 è rappresentata la distribuzione delle specie tipizzate. I lotti provenivano da 43 aziende regionali, di cui 30 (69,8%; IC: 53,9%-82,8%) risultate positive e 41 aziende extraregionali, di cui 17 positive (41,5%; IC 95%: 26,3%-57,9%). Le differenti prevalenze riscontrate tra campioni regionali ed extraregionali sono risultate significative ($p < 0,01$) a livello di azienda, ma non al livello di lotti ($p > 0,05$).

La figura 4 riporta la distribuzione temporale del campionamento e le percentuali di positività

durante i mesi dell'anno. E' possibile osservare una più alta percentuale di campioni positivi su campioni eseguiti nel periodo giugno-settembre (66,67%).

Nel 9,6% dei lotti positivi è stata osservata una co-infezione da *C. jejuni* e *C.coli*.

Analisi su carcassa Dall'analisi qualitativa delle carcasse risulta che il 26,0% (IC 95%: 17,7%-35,7%) dei campioni esaminati presenta contaminazione esterna da *Campylobacter* spp. termofili. La specie predominante risulta essere *C. jejuni* (Figura 2).

La ricerca quantitativa di *Campylobacter* spp. ha evidenziato una carica rilevabile su carcassa nel 24,2% (IC 95%: 16,2%- 33,9%) dei lotti, con valori che vanno da 1,3 Log (UFC/g) a 7,2 Log (UFC/g); media 3,5 Log (UFC/g).

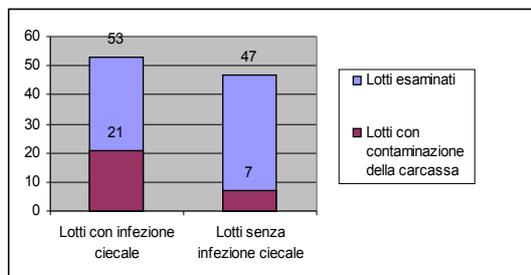


Fig.3. Correlazione tra infezione intestinale e contaminazione della carcassa (OR: 3,75)

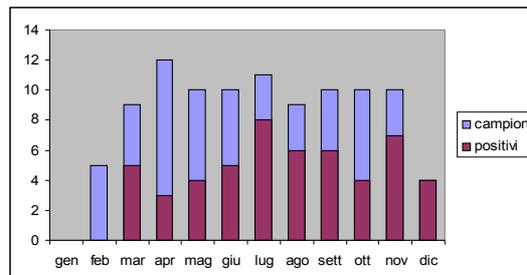


Fig.4. Andamento temporale della ricerca di *Campylobacter* spp. nel contenuto ciecale

Esaminando la correlazione tra la presenza di *Campylobacter* spp. nei ciechi e la presenza di contaminazione sulla superficie delle carcasse nei lotti macellati (fig. 3), emerge che l'infezione intestinale del gruppo rappresenta un fattore di rischio (O.R.: 3,8; I.C. 95%: 1,4-9,9) per la successiva contaminazione delle carcasse durante le operazioni di macellazione.

CONSIDERAZIONI E CONCLUSIONI - I dati bibliografici disponibili sulla diffusione di *Campylobacter* spp. nei gruppi di *broiler* sono variabili e difficilmente confrontabili, per differenze nel disegno del campionamento o nella scelta delle metodiche diagnostiche. Non trascurabile è, per esempio, il periodo dell'anno in cui l'indagine viene eseguita, tenuto conto della variabilità stagionale nella diffusione di *Campylobacter* spp, documentata in numerosi lavori (14; 23; 26; 27). Nella nostra indagine viene osservata una più alta percentuale di campioni positivi su campioni eseguiti nel periodo estivo.

In Europa sono stati riportati valori di prevalenza di gruppi infetti che vanno dallo 0% all'82,8% (5; 6; 19; 20); valori più bassi vengono riportati nei Paesi scandinavi (17).

La prevalenza media osservata in Emilia-Romagna nel 2008 nei gruppi di *broilers* si pone su un livello paragonabile a quello rilevato in altre indagini. In uno studio condotto in Veneto (21) è risultato infetto l'82,8% dei gruppi, dato che supporta l'evidente ampia diffusione di *Campylobacter* spp. negli allevamenti di *broilers*. Da un'analisi della distribuzione degli isolati da contenuto intestinale, emerge nel nostro studio la predominanza delle due specie *C. jejuni* e *C. coli*, anche se il rapporto tra le due è in disaccordo con quanto riportato in letteratura (20), essendo lievemente a favore di *C. coli*.

Per quanto riguarda la contaminazione delle carcasse, anche in questo caso il confronto con altri dati disponibili in letteratura è da considerare con cautela, per esempio per il fatto che campionando in diverse fasi di macellazione si possono avere diverse prevalenze di contaminazione della superficie della carcassa. In questo lavoro il campionamento è stato eseguito alla fine della fase di raffreddamento, in cui è dimostrato (5; 16) che si riscontrano livelli di *Campylobacter* spp. quantitativamente più bassi e valori di prevalenza più alti, dovuti evidentemente a cross-contaminazione.

In Emilia Romagna è stata osservata una prevalenza sulle carcasse del 26,0% (IC 95%: 17,7%-35,7%). In uno studio condotto precedentemente nella stessa Regione è risultata una positività del

35,7% (4), mentre in Abruzzo e Molise del 40,8% (18); in entrambi i casi il campionamento è stato eseguito in fasi diverse rispetto a quella del nostro lavoro. A livello comunitario, i dati riportati da EFSA per il 2007 mostrano ampia variabilità, ma comunque in molti Stati Membri le prevalenze sono superiori al 20%.

I valori di carica rilevati sono distribuiti con una media pari a 3,5 Log UFC/g, molto simile a dati riscontrati in letteratura (2; 13).

Diversi studi confermano i nostri risultati per quanto riguarda l'influenza che ha, sulla contaminazione delle carcasse, l'infezione intestinale dei gruppi che arrivano in fase di macellazione (24; 20). In alcuni Paesi, come la Danimarca, gli interventi per il controllo della campilobatteriosi sono indirizzati alla riduzione di *Campylobacter* spp. negli allevamenti di *broiler* (25), oltre che ad attività condotte al macello. Le misure di controllo sulla produzione primaria hanno portato in molti casi ad una riduzione della prevalenza dei gruppi infetti; l'implementazione di norme di biosicurezza messe in atto nei Paesi dell'Unione Europea nell'ambito dei Piani di controllo delle salmonellosi dovrebbero avere effetto anche sui livelli di diffusione di *Campylobacter* spp. Alcuni autori sostengono che l'efficacia delle azioni di controllo condotte al macello nel ridurre l'incidenza di campilobatteriosi umana sia superiore di circa 30 volte rispetto alle misure di biosicurezza in allevamento (22).

In attesa di una più approfondita analisi del rischio, a cui conseguirà la scelta delle misure di controllo ritenute più efficaci in termini di costi e benefici, andrebbe certamente considerata una campagna di educazione del consumatore, indirizzata ad una riduzione significativa del rischio di cross-contaminazione in ambiente domestico e all'adeguata cottura dei cibi prima del consumo.

BIBLIOGRAFIA

1. Ang W.C., Jacobs B.C., Laman J.D. (2004). The Guillain-Barré syndrome : a true case of mimicry. *Trends Immunology*, 25 (2): 61-66
2. Berrang M.E., Smith D.P., Windham W.R., Feldner P.W. (2004) Effect of intestinal content contamination on broiler carcass *Campylobacter* counts. *Journal of Food Protection*, 67 (2): 235-238
3. Butzler J. P., Oosterom J. (1991) *Campylobacter*: pathogenicity and significance in foods. *International Journal of Food Microbiology*, 12: 1-8
4. Cocchi M., Massi P., Tosi G., Tamba M. (2001) Presenza di *Campylobacter* spp. nella carne di pollame macellata in Romagna. *Large Animals Review*, 7 (6): 77-78
5. EFSA (2009) The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses and Zoonotic Agents In The European Union in 2007. *The EFSA Journal* (2009) 223
6. Evans S.J. and Sayers A.R. (2000) A longitudinal study of *Campylobacter* infection of *broiler* flocks in Great Britain. *Prev. Vet. Med.*, 46: 209-223
7. Friedman C.R., Hoekstra R.M., Samuel M., Marcus R., Bender J., Shiferaw B., Reddy S., Ahuja S.D., Helfrick D.L., Hardnett F., Carter M., Anderson B., Tauxe R.V. (2004) Risk factors for sporadic *Campylobacter* infection in the United States: a case control study in FoodNet sites. *Clinical Infectious Diseases*, 38 (suppl. 3): S285-S296
8. Herman L., Heyndrickx M., Grijspeerdt K., Vandekerckhove D., Rollier I., De Zutter L. (2003) Routes for *Campylobacter* contamination of poultry meat: epidemiological study from hatchery to slaughterhouse. *Epidemiology and Infection*, 131: 1169-1180
9. ISO (2002) Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs-Horizontal Method for the Detection and enumeration of *Campylobacter* growing at 41,5°C – Part 1: detection method ISO/CD10727-1
10. ISO (2006) Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs-Horizontal Method for the Detection and enumeration of *Campylobacter* growing at 41,5°C – Part 2: detection method ISO/CD10727-2

11. ISS (Istituto Superiore di Sanità) (2009) *Campylobacter*: aspetti epidemiologici. <http://www.epicentro.iss.it/problemi/campylobacter/epid.asp>
12. Jay J.M., Loessner M.J., Golden D.A. (2005) *Modern Food Microbiology* (7th ed.). Springer Science and Business Media, Inc., New York
13. Kapperud G., Skjerve E., Bean N., Ostroff S.M., Lassen J. (1992) Risk factors for sporadic *Campylobacter* infections: Results of a case-control study in south-eastern Norway. *J. Clinical Microbiology*, 30: 3117-3121
14. Lienau J.A., Ellerbroek L., Klein G. (2007) Tracing flock-related *Campylobacter* clones from broiler farms through slaughter to retail products by pulsed-field gel electrophoresis. *Journal of Food Protection*, 70: 536-542
15. Mylius S.D., Nauta M.J., Havelaar A.H. (2007) Cross-contamination During Food Preparation: A Mechanistic Model Applied to Chicken-Borne *Campylobacter*. *Risk Analysis* Vol. 27, N. 4: 803-813
16. Nauta M.J., Jacobs-Reitsma W.F., Havelaar A.H. (2007) A Risk Assessment Model for *Campylobacter* in Broiler Meat. *Risk Analysis*, Vol 27, No. 4: 845-861
17. Newell, D.G. and Fearnley C. (2003) Sources of *Campylobacter* colonization in *broiler* chickens. *Appl. Environmental Microbiology*, 69: 4343-4351
18. Prencipe V., Parisciani G., Calistri P., Caporale C.M., Iannitto G., Morelli D., Pomicino F., Prochowski D., Migliorati G. (2007) *Campylobacter* termotolleranti nelle carni avicole commercializzate nelle regioni Abruzzo e Molise: prevalenze e livelli di contaminazione. *Veterinaria Italiana*, 43 (1): 157-165
19. Refregier-Petton J., Rose N, Denis M., Salvat G. (2001) Risk factors for *Campylobacter* sp. contamination in French *broiler*-chicken flock at the end of the rearing period. *Prev. Vet. Med.*, 50: 89-100
20. Reich F., Atanassova V., Haunhorst E., Klein G. (2008) The effects of *Campylobacter* numbers in caeca on the contamination of *broiler* carcasses with *Campylobacter*. *International Journal of Food Microbiology*, 127: 116-120
21. Ricci A., Amato s., Barco L. (2006) Prevalence of *Campylobacter* spp. in broiler chicken farms of Veneto Region. *Rivista di Avicoltura*, 75 (6): 15-15
22. Rosenquist H., Nielsen N.L., Sommer H.L., Norrung B., Christensen B.B. (2003) Quantitative Risk Assessment of human campylobacteriosis associated with thermophilic *Campylobacter* species in chickens. *International Journal of Food Microbiology*, 83: 87-103.
23. Sari K.R., Edwards S.J., Charron D. (2004) Climate variability and campylobacter infection an international study. *Int. J. Biometeorol.*, 22: 207-214
24. Stern N.J., Robach M.C. (2003) Enumeration of *Campylobacter* spp. in Broiler Feces and in Corresponding Processed Carcasses. *Journal of Food Protection*, Vol. 66, No 9: 1557-1563
25. Wagenaar J.A., Mevius D.J., Havelaar A.H. (2006) *Campylobacter* in primary animal production and control strategies to reduce the burden of human campylobacteriosis. *Rev. Sci. Tech.*, 25: 581-594
26. Wallace J., Stanley K., Currie J., Diggle P., Jones J. (1997) Seasonality of thermophilic *Campylobacter* populations in chickens. *J. Appl. Microbiol.*, 82: 219-224
27. Wedderkopp A., Gradel K.O., Jorgense J.C., Madsen M. (2001) Pre-harvest surveillance of *Campylobacter* and *Salmonella* in Danish broiler flock: a 2-year study. *International Journal of Food Microbiology*, 68: 53-59