

# QUANTIFICAZIONE DI *CAMPYLOBACTER* SPP. SULLA CUTE DI BROILER MACELLATI

## QUANTITATIVE ASSESSMENT OF *CAMPYLOBACTER* SPP. ON POULTRY CARCASSES

Alberghini L.<sup>1</sup>, Colavita G.<sup>2</sup>, Giaccone V.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Sanità Pubblica, Patologia Comparata e Igiene Veterinaria Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Padova, Legnaro (PD).

<sup>2</sup>Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agro Alimentari, Ambientali e Microbiologiche, Università del Molise, Campobasso.

### SUMMARY

*Campylobacter* spp. are bacterial pathogens associated with human gastroenteritis worldwide. In Europe, campylobacteriosis is one of the leading food-borne bacterial diseases and the consumption of poultry meats is suspected to be one of the major causes of illness. The aim of our research was to determine the number of *Campylobacter* spp. in poultry carcasses and in poultry meat samples during their storage till to retail markets. The study was conducted from February 2009 to February 2010 at slaughterhouse in Veneto region, followed by a test of fresh poultry meat placed on the market for sale. A total of 90 poultry carcass and 90 samples of poultry meat were examined. The quantitative examination resulted in *Campylobacter* spp. counts (mean): for carcasses between  $2,0 \cdot 10^1$  ufc/g and  $1,5 \cdot 10^3$  ufc/g ( $4,2 \cdot 10^2$ ) and poultry meat between  $2,0 \cdot 10^1$  ufc/g and  $3,7 \cdot 10^2$  ufc/g ( $8,1 \cdot 10^1$ ). The majority of isolates were classified as *Campylobacter jejuni* (58,3%), *Campylobacter coli* (22,9%) or *Arcobacter cryaerophilus* (4,2%). Acknowledgments: The project was funded with grants from Fondazione Cariverona 2007.

### KEYWORDS

*Campylobacter* spp., food hygiene, poultry meat.

### INTRODUZIONE

I batteri del genere *Campylobacter* sono importanti agenti di malattia alimentare e le carni avicole svolgono un ruolo significativo nella loro diffusione. Gli esperti dell' Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (EFSA) affermano che una percentuale compresa tra il 20 e il 30 % dei casi umani di campilobatteriosi, nell'Unione Europea, sono direttamente riconducibili alla manipolazione, alla preparazione e al consumo di carne ottenuta dai broiler (1). I dati riferiti dall' EFSA e dal Centro europeo per la prevenzione e il controllo delle malattie dimostrano che *Campylobacter* spp. è il principale agente di zoonosi alimentari, pur con una differente prevalenza tra gli stati membri. Per il 2007, tali dati fanno registrare un aumento dei casi di campilobatteriosi nell'uomo pari al 14,2%, ri-

spetto l'anno precedente (2). In tal senso, sono intervenuti diversi fattori tra cui le caratteristiche di virulenza del microrganismo, la resistenza del sistema immunitario dell'ospite che ingerisce l'alimento inquinato e la carica infettante che il microrganismo raggiunge nell'alimento al momento del consumo. Nel 2008, pur restando la zoonosi alimentare più diffusa, la campilobatteriosi ha fatto segnare un calo di casi notificati pari al 5% (3). In riferimento alla Direttiva 2003/99/CE sulle zoonosi, l'obiettivo della nostra ricerca è quello di produrre dati, circa il piano di campionamento adottato per definire la prevalenza di *Campylobacter* spp. nelle carcasse di polli e sulle metodiche di laboratorio utilizzate per l'isolamento del patogeno. In Italia non sono ancora disponibili dati sufficienti circa l'incidenza dei casi di gastroenteriti da *Campylobacter* spp. nell'uomo, poiché, qualora notifica-

ti, i casi clinici specifici non sono distinti da quelli causati da altre infezioni (4). Scopo del presente lavoro è stato quello di quantificare la presenza di *Campylobacter* spp. nelle carni di pollo e di identificare la specie di appartenenza dei ceppi isolati.

## MATERIALI E METODI

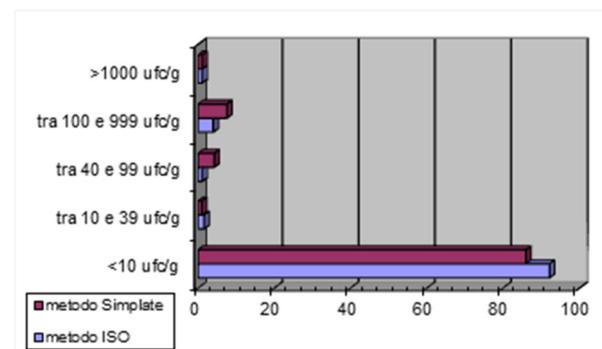
I prelievi sono stati eseguiti presso uno stabilimento di macellazione, con una capacità di macellazione (stima numero di broiler macellati nel 2007) superiore a 10 milioni capi/anno e presso un punto vendita di carni avicole, entrambi localizzati in Veneto. L'età dei broiler macellati variava da un minimo di 48 a un massimo di 54 giorni. I campionamenti sono stati effettuati, con cadenza mensile, nel periodo Febbraio 2009-Febbraio 2010. Per ciascun lotto, il piano di campionamento prevedeva il prelievo di 6 carcasse di pollo a busto e 2 porzioni rispettivamente di cosce, ali e petto confezionate. In totale sono state analizzate 90 carcasse, 30 confezioni di cosce, 30 confezioni di ali e 30 confezioni di petto di pollo. Il trasporto e il prelievo al laboratorio è stato attuato secondo la procedura interna dell'IZS dell'Abruzzo e del Molise (IZS TE B313 C SCH 001). La numerazione di *Campylobacter* termotolleranti è stata effettuata parallelamente sia secondo le modalità operative riportate nella norma ISO/EN 10272-2: 2006, sia per mezzo del metodo SimPlate (Biocontrol). Da 10 ml di sospensione iniziale sono stati prelevati 0,1 ml per effettuare diluizioni seriali e seminati in doppio, per permettere il conteggio fino a  $10^6$  ufc/g. Inoltre, 1 ml di sospensione iniziale non diluita è stato seminato in parallelo, per ottenere almeno un limite di conteggio di 10 ufc/g, come specificato nella Decisione della Commissione 2007/516/CE del 19/7/07. I ceppi isolati sono stati passati in subcoltura su Columbia Blood Agar (Oxoid) e successivamente identificati in base alle caratteristiche biochimiche, per mezzo di gallerie Api Campy (bioMérieux).

## RISULTATI

Analizzando i campioni con la metodica ISO si è osservato una percentuale di campioni positivi pari all'8% (6% carcasse, 2% porzionato), mentre con il metodo SimPlate erano pari all'11% (8% carcasse, 3% porzionato). Le cariche inquinanti individuate secondo la norma ISO nelle carcasse variavano da un minimo di  $2,0 \cdot 10^1$  ufc/g a un massimo di  $1,5 \cdot 10^3$  ufc/g (valore medio:  $4,2 \cdot 10^2$  ufc/g), mentre con il metodo SimPlate variavano da un minimo di  $2,0 \cdot 10^1$  ufc/g a un massimo di  $1,2 \cdot 10^3$  ufc/g (valore medio:  $3,8 \cdot 10^2$

ufc/g). Le cariche individuate secondo la norma ISO nelle carni sezionate variavano da un minimo di  $2,0 \cdot 10^1$  ufc/g a un massimo di  $3,7 \cdot 10^2$  ufc/g (valore medio:  $8,1 \cdot 10^1$  ufc/g), mentre con il secondo metodo variavano da un minimo di  $6,0 \cdot 10^1$  ufc/g a un massimo di  $1,8 \cdot 10^2$  ufc/g (valore medio:  $1,1 \cdot 10^2$  ufc/g). I campioni di prodotto porzionato prelevati presso il punto vendita, hanno fatto registrare gli stessi livelli di contaminazione con entrambe le metodiche utilizzate, in quanto sono risultate contaminate solamente 2 carcasse, con valori rispettivamente di  $2,0 \cdot 10^1$  ufc/g e  $4,0 \cdot 10^1$  ufc/g. Il periodo dell'anno nel quale si sono rilevati i maggiori livelli di contaminazione con entrambi i metodi analitici è stato quello da Giugno a Luglio. La ripartizione percentuale dei casi positivi, in relazione alla carica contaminante, è riportata nella tabella n.1.

**Tabella n.1:** Risultati della ricerca di *Campylobacter* spp. e ripartizione percentuale dei casi positivi, in relazione alla carica rilevata e al metodo di isolamento.



Complessivamente sono stati isolati 48 ceppi di *Campylobacter* termo tolleranti ed in base al loro profilo biochimico, 28 ceppi (58,3%) sono stati identificati come: *Campylobacter jejuni*, 11 ceppi (22,9%) come *Campylobacter coli*, 2 ceppi (4,2%) come *Arcobacter cryaerophilus* e 7 ceppi (14,6 %) sono risultati non identificabili.

## CONSIDERAZIONI E CONCLUSIONI

La determinazione della carica di *Campylobacter* spp. è stata effettuata con il metodo ufficiale ISO e il metodo SimPlate a confronto, anche perché quest'ultimo risulta di semplice interpretazione e a differenza del metodo tradizionale si ottiene un risultato in 48 ore. Il metodo SimPlate è costituito da piastre a pozzetti, dotate di terreni disidratati e pronti all'uso. L'operazione di analisi consiste nel ricostituire il terreno e aggiungere il campione da analizzare e seminare in piastra. L'esame microscopico

consente di rilevare i batteri vivi nei pozzetti e mediante una reazione cromogena, la conferma in fluorescenza dei falsi positivi. Purtroppo con il Regolamento 2005/2073/CE sono considerati ufficiali i soli metodi EN o ISO, mentre i metodi alternativi devono essere validati secondo il nuovo protocollo ISO EN 16140 (5), cosa non attuabile per il nostro laboratorio.

**Tabella 2.** Risultati dell'indagine EFSA e confronto della ripartizione percentuale dei casi positivi rilevati nello studio in relazione alla carica di *Campylobacter* spp.

	< 10 ufc/g	10-39 ufc/g	40-99 ufc/g	100-999 ufc/g	≥ 1000 ufc/g
ISO	92,2%	1,7%	1,1%	3,9%	1,1%
SimPlate	85,7%	0,7%	3,6%	8,6%	1,4%
Italia	62,6%	5,9%	3,3%	15,8%	12,4%
UE	47,0%	7,5%	4,7%	19,3%	21,5%

I dati da noi ottenuti, con entrambi i metodi, indicano una bassa contaminazione sia delle carcasse che del prodotto porzionato, mentre in base ai dati pubblicati dall'EFSA, scaturiti da una ricerca svolta nel 2008 su 10132 campioni provenienti da 561 macelli in 25 Stati membri dell'UE, il 76% delle carcasse risultavano contaminate da *Campylobacter* spp. (Tabella n.2) (6).

E' utile ricordare che la bassa attività biochimica del microrganismo e la conseguente variabilità nei risultati dei test può rendere poco agevole l'identificazione di *Campylobacter* spp. (7). Infatti, nel corso della stessa indagine EFSA non è stato possibile identificare il 5,5% dei ceppi isolati. (6). Inoltre, il controllo qualità asseriva di aver registrato diverse difficoltà nell'identificazione rilevando, per esempio, tre ceppi di *Arcobacter* o *Helicobacter* erroneamente identificati come *Campylobacter* spp. Alla luce di questi dati, possiamo affermare che i metodi microbiologici tradizionali hanno dei limiti, come ad esempio tempi abbastanza lunghi per lo svolgimento delle analisi e l'identificazione basata su prove biochimiche/fenotipiche. La necessità di affiancare metodologie analitiche di tipo molecolare, come avviene per la ricerca qualitativa, diventa sempre più impellente. Come specificato nella Decisione della Commissione 2007/516/CE, la conferma dell'identificazione di specie per *Campylobacter* spp. deve essere effettuata mediante PCR. L'utilizzo di tali metodologie basate sulla reazione a catena della polimerasi risulta più attendibile delle metodiche tradizionali nell'identificare questi batteri (4). Il rilievo contemporaneo di diversi genotipi nello stesso

campione (8), inoltre, stimola ad approfondire le indagini epidemiologiche volte all'individuazione delle fonti di inquinamento. A tal proposito, l'EFSA pone particolare attenzione al metodo di tipizzazione *Multi-Locus Sequence Typing* (1) e auspica l'adozione di tecniche di genotipizzazione per coadiuvare i sistemi d'indagine (9). In Italia, ad esempio, alcune informazioni epidemiologiche sono reperibili grazie alla rete informativa CampyNet (10). Si impone, quindi, la necessità di sviluppare ulteriormente le metodiche di diagnostica molecolare, allo scopo di identificare, con maggiore precisione ed attendibilità del dato, i microrganismi di cui si richiede la determinazione della carica contaminante gli alimenti.

## BIBLIOGRAFIA

1. EFSA (2010). Scientific Opinion on Quantification of the risk posed by broiler meat to human campylobacteriosis in the EU. *EFSA Journal* 8 (1):1437, 1-89.
2. EFSA (2009). The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses and Zoonotic Agents in the European Union in 2007. *EFSA Journal*, 223.
3. EFSA (2010). The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses and Zoonotic Agents in the European Union in 2008. *EFSA Journal*, 1496.
4. Di Giannatale E., Alessiani A., Principe V., Migliorati G. (2009). Tossinfezioni da *Campylobacter*. Analisi, controlli e iniziative future. *Alimenti & bevande*, 11 (5), 25-31.
5. Perneti V. (2006). Validazione dei metodi di analisi. Le novità del protocollo ISO EN 16140. *Alimenti & bevande*, 8 (11\12), 35-38.
6. EFSA (2010). Analysis of the baseline survey on the prevalence of *Campylobacter* in broiler batches and of *Campylobacter* and *Salmonella* on broiler carcasses in the EU, 2008. *EFSA Journal* 8 (03):1503, 1-99.
7. Ripabelli G., Fanelli I., Sammarco M.L., Luzzi I. (2004). Confronto tra tecniche tradizionali e molecolari per l'identificazione di *Campylobacter* spp. in campioni di carne. IV Workshop Nazionale Enter-net, Diagnostica ed epidemiologia delle zoonosi trasmesse da alimenti. ISTISAN, 83.
8. Parisi A., Addante N., Pedarra A., Montagna C.O., Normanno G., Merico. (2005). Contaminazione multipla da campilobatteri termofili in carne di pollo. *Industrie Alimentari*, XLIV, 767-770.
9. Principe V., Parisciani G., Calistri P., Caporale C.M., Iannito G., Morelli D., Pomicio F., Prochowski D., Migliorati G. (2007). *Campy-*

*lobacter* termotolleranti nelle carni avicole commercializzate nelle regioni Abruzzo e Molise: prevalenza e livelli di contaminazione. *Veterinaria Italiana*, 43 (1), 157-165.

10. Trevisani M. (2008). Corrette prassi igieniche nelle produzioni avicole primarie. *A.I.V.I.* (0), 67-72.