IZSAM G.CAPORALE
TERAMO

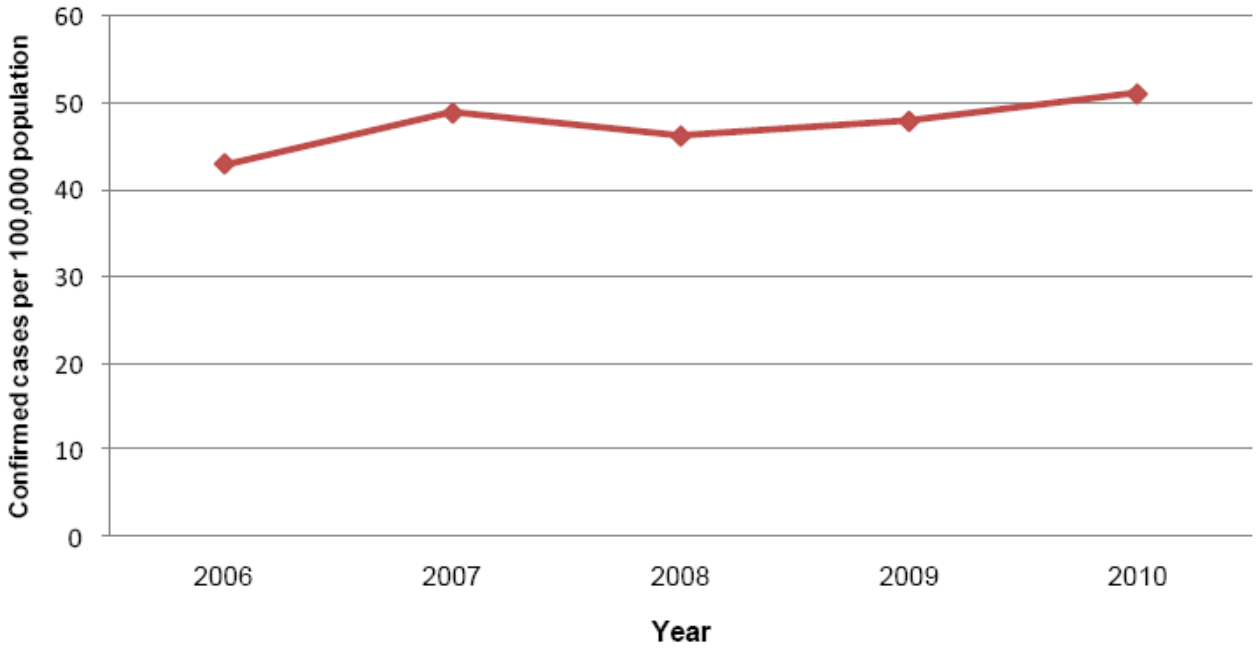
Studio della prevalenza del *Campylobacter* nella filiera del pollo da ingrasso e della contaminazione delle carcasse durante la macellazione

Di Serafino G. Di Giannatale E.

Teramo 23.05.2013

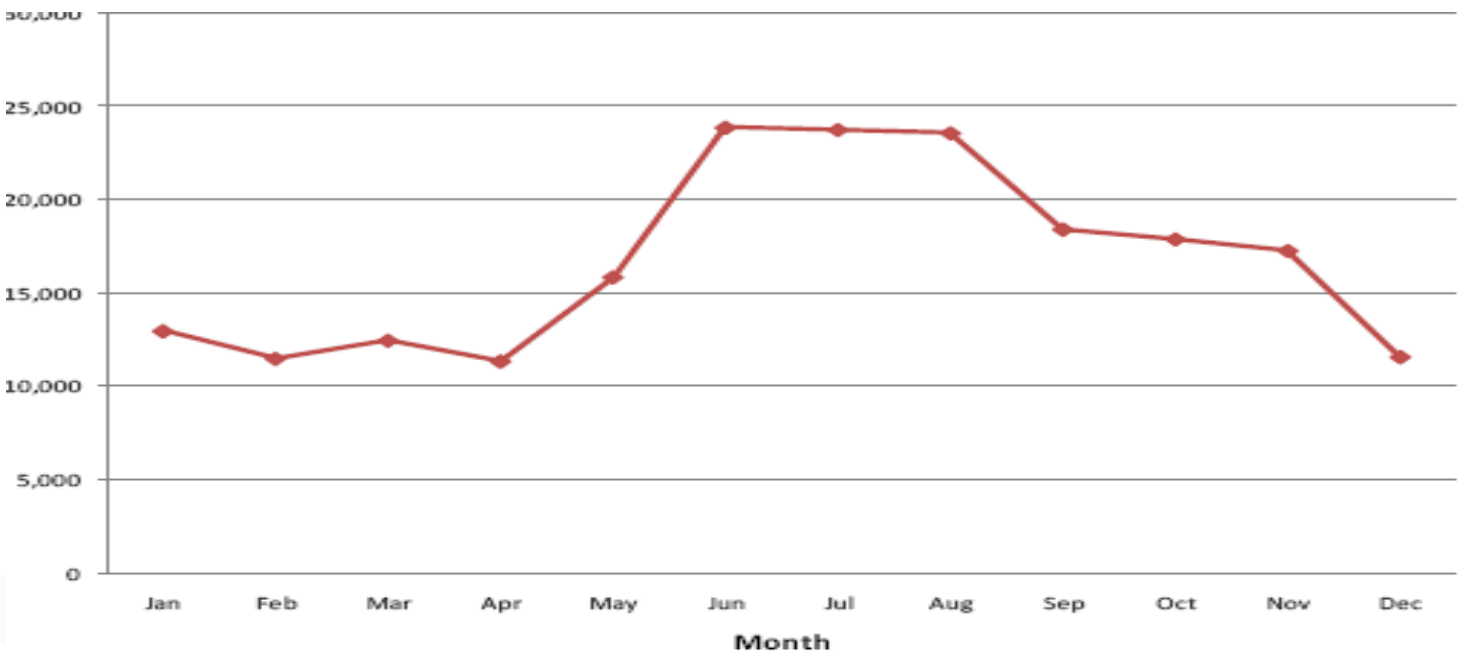
Casi umani di Campylobacteriosi 2006-2010 in EU

EFSA Journal 2012;10(3):2597 (dati EFSA/ECDC)



Source (for EU trend): Austria, Belgium, Bulgaria, Cyprus, Czech Republic, Denmark, Estonia, Finland, France, Germany, Hungary, Ireland, Italy, Latvia, Lithuania, Luxembourg, Malta, Netherlands, Poland, Slovakia, Slovenia, Spain, Sweden, and United Kingdom.

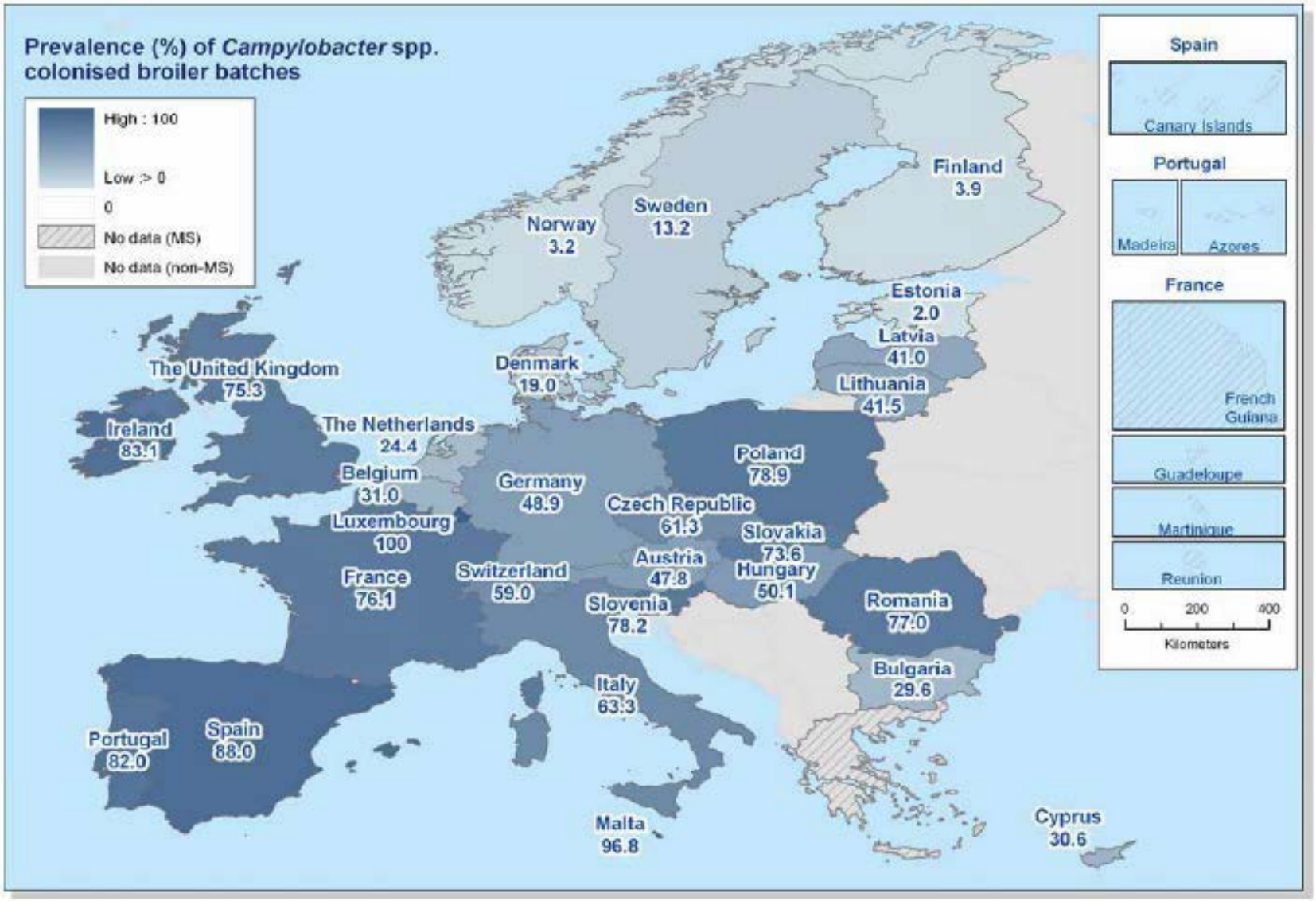
Numero dei di Campylobacteriosi confermati nell'uomo per mese, in EU nel 2010



All MSs except Greece, Portugal and Romania (N=200,435)

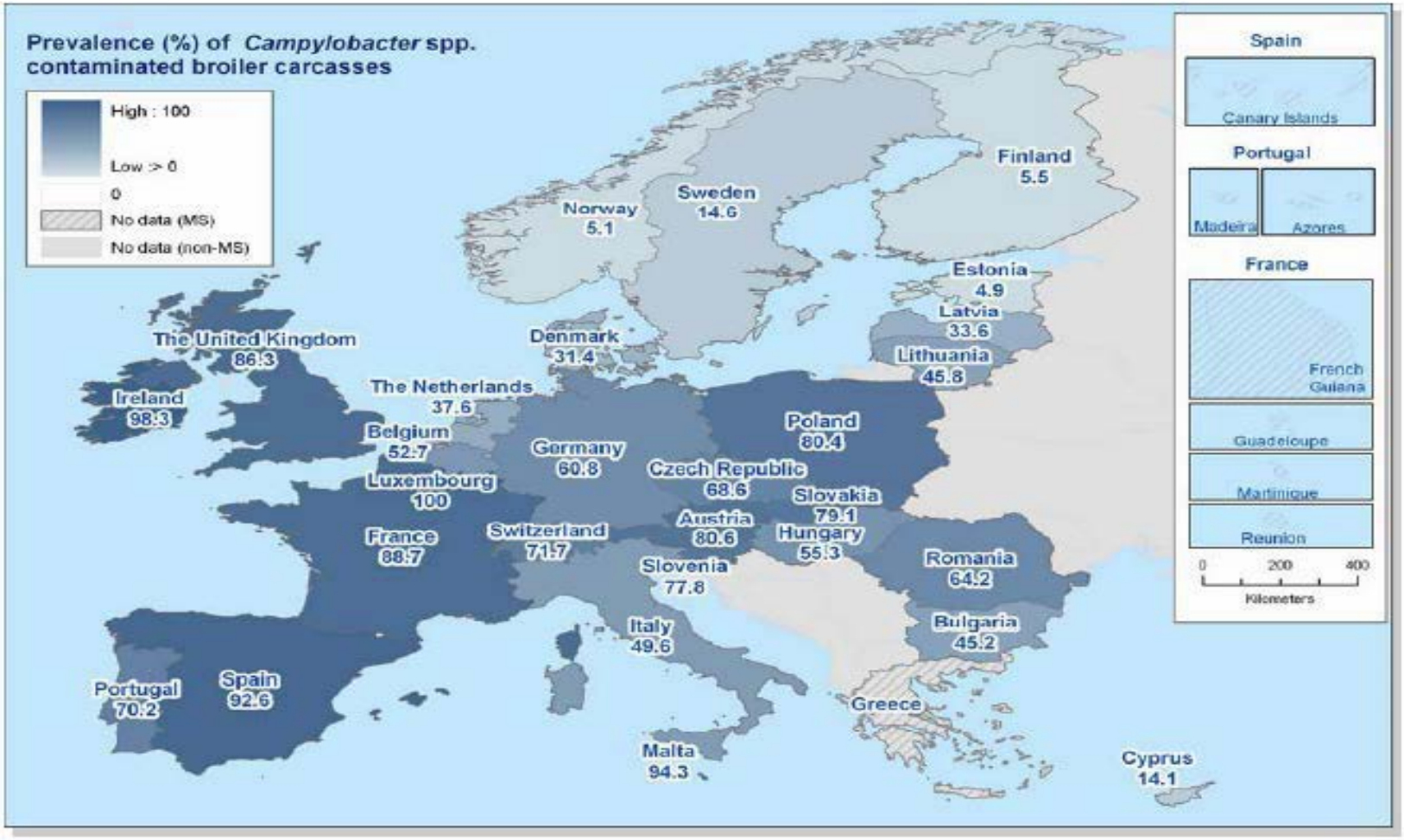
Baseline study 2008

Report EFSA 2010 a



Esempio: Baseline study 2008

Report EFSA 2010b



Qual è la via di penetrazione e diffusione del Campylobacter nelle aziende avicole?

- Attraverso animali infetti
- Attraverso vettori animati o inanimati
- Persistenza nell'ambiente di allevamento

SCIENTIFIC OPINION

Parere scientifico sulla quantificazione del rischio di campilobatteriosi umana causata dalla carne di pollo nell' Unione Europea

EFSA Journal 2010; 8(1):1437

…. la manipolazione, preparazione e consumo di carne di pollo è responsabile del 20% - 30% dei casi di Campylobacteriosi umana, mentre il 50% - 80% potrebbe essere dovuto al pollo come riserva nel suo complesso …..

Il *Campylobacter* nella filiera avicola….

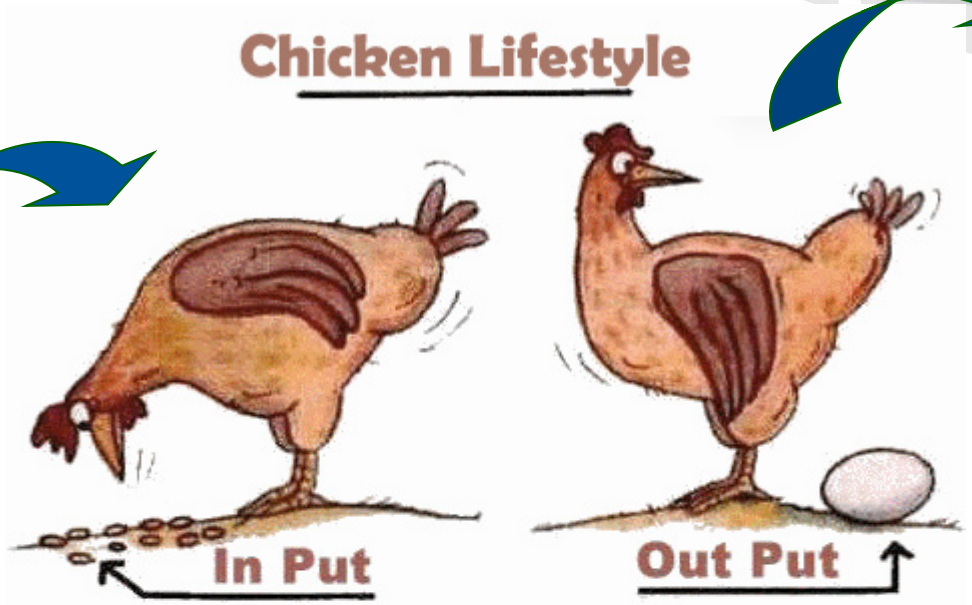
- Lack of evidence for vertical transmission of Campylobacter spp. in chickens (Callicott et al., 2006).
- Recovery of Campylobacter from commercial broiler hatchery trayliners (Byrd et al., 2007).

- Occurrence and genotypes of Campylobacter in broiler flocks, other farm animals, and the environment during several rearing periods on selected poultry farms (Zweifel et al., 2008).
- Farm and environmental distribution of Campylobacter in broiler flocks (Thakur et al., 2012).

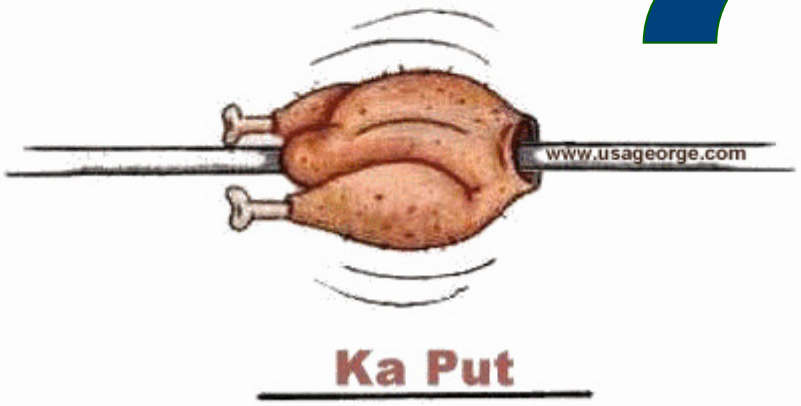
- Longitudinal molecular epidemiological study of Thermophilic Campylobacter on one conventional broiler chicken farm (Ridley et al., 2010).
- Prevalence and risk factors for Campylobacter spp. contamination of broiler chicken carcasses at the slaughterhouse (Hue et al., 2010).

IZSAM G.CAPORALE TERAMO

Allevamento



Incubatoio



Mattatoio

Campionamento

- 2 allevamenti: 1) Allevamento A;
  2) Allevamento B.

- 8 cicli di campionamento: 2 per stagione

- Per ogni stagione è stato effettuato un ciclo per ciascun allevamento

Prelievo campioni all'incubatoio

▸Ingresso uova:

- 30 uova;
- tamponi ambientali (rack, canaline).

▸Sala incubazione:

-tamponi ambientali (pavimento, parete, pale ventola).

▸Sala schiusa:

-tamponi ambientali (pavimento, parete, pale ventola, canaline).

▸Sala lavorazione pulcini:

-30 uova non schiuse;

-tamponi ambientali (giostra sessaggio, giostra vaccinazione, nastro, macchina vaccinazione, fondo scatole).

Prelievo campioni in allevamento

▸15 giorni prima dell'accasamento:
- Alphitobius diaperinus;
- tamponi ambientali (beverini, mangiatoie, pale ventola, pavimento).

▸Accasamento:
-tamponi ambientali (contenitori di trasporto);
-mangime starter

▸30 giorni dall'accasamento:
-pollina;
-tamponi ambientali (beverini, mangiatoie, pale ventola);
-mangime di accrescimento;
-acqua di lago.

▸Uscita:
-tamponi cloacali (effettuati su 50 polli);
-mangime di finissaggio.

Prelievo campioni al mattatoio

- 35 polli:

- cute post deiugulazione;
- cute post spennatura;
- cute post eviscerazione;
- intestini ciechi;
- cute post lavaggio;
- cute post raffreddamento.

- Tamponi ambientali:

- guidovie;
- macchina spennatrice;
- macchina evisceratrice;
- macchina di lavaggio;
- tunnel di raffreddamento.

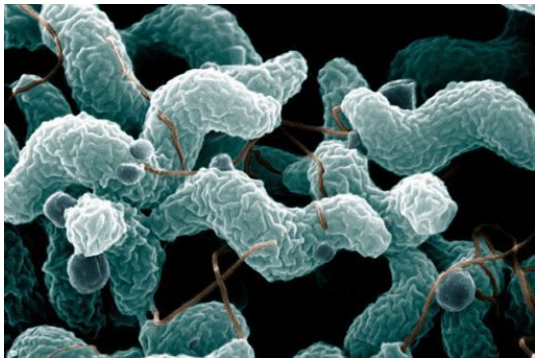
Campioni considerati per ciclo

		N. tamponi cloacali	N. polli
I ciclo	allevamento A	50	45
II ciclo	Allevamento B	50	36
III ciclo	Allevamento B	50	21
IV ciclo	Allevamento A	50	16
V ciclo	Allevamento A	50	30
VI ciclo	Allevamento B	50	29
VII ciclo	Allevamento A	50	26
VIII ciclo	Allevamento B	50	18

Metodi

Totale campioni: 2145

Ricerca *Campylobacter spp.* (ISO 10272-1:2006)



- Cute e intestini ciechi: numerazione *Campylobacter spp.* (ISO 10272-2:2006).
- Real-Time PCR: effettuata dai brodi di arricchimento.

Numerazione *Campylobacter*

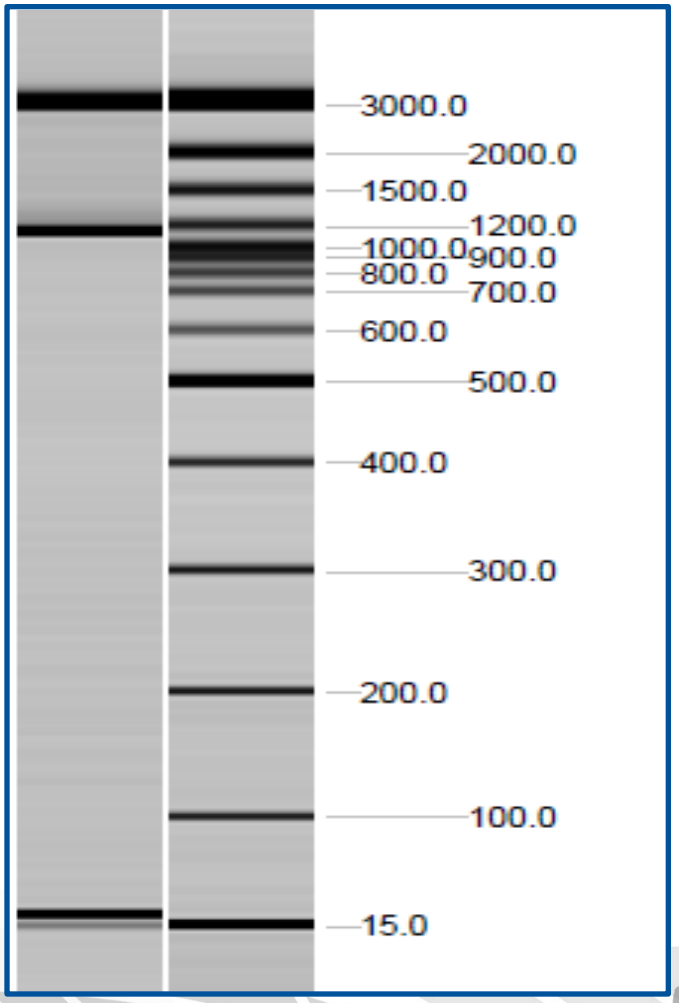
		Cute post deiug.	Cute post spenn.	Cute post evisc.	Cute post lavag.	Cute post refrig.	Ciechi
Allevamento A	I ciclo	10^3 - 10^5	<10	10^2 - 10^3	10^2	10^2 - 10^4	10^2 - 10^7
	IV ciclo	10^3 - 10^4	10^2 - 10^3	10^2 - 10^4	10^2	10^2 - 10^3	10^3 - 10^7
	V ciclo	10^3 - 10^4	10^2 - 10^3	10^2 - 10^3	10^2 - 10^3	10^2 - 10^3	10^3
	VII ciclo	10^3 - 10^5	10^1 - 10^3	10^1 - 10^4	10^2 - 10^3	10^2 - 10^3	10^3 - 10^7
Allevamento B	II ciclo	10^3 - 10^8	<10	10^2 - 10^3	10^2	10^2 - 10^3	10^3 - 10^8
	III ciclo	10^1 - 10^6	<10 - 10^2	10^2 - 10^3	10^2	10^2 - 10^3	10^1 - 10^6
	VI ciclo	10^1 - 10^4	10^2 – 10^3	10^2 - 10^3	10^2 - 10^3	10^3	10^3 - 10^6
	VIII ciclo	10^3 - 10^6	<10	10^2 - 10^3	10^2	10^2 - 10^4	10^4 - 10^8

Metodi

PCR gene 16S rRNA: famiglia delle *Campylobacteriaceae*

16S

1125 bp



-Campylobacter

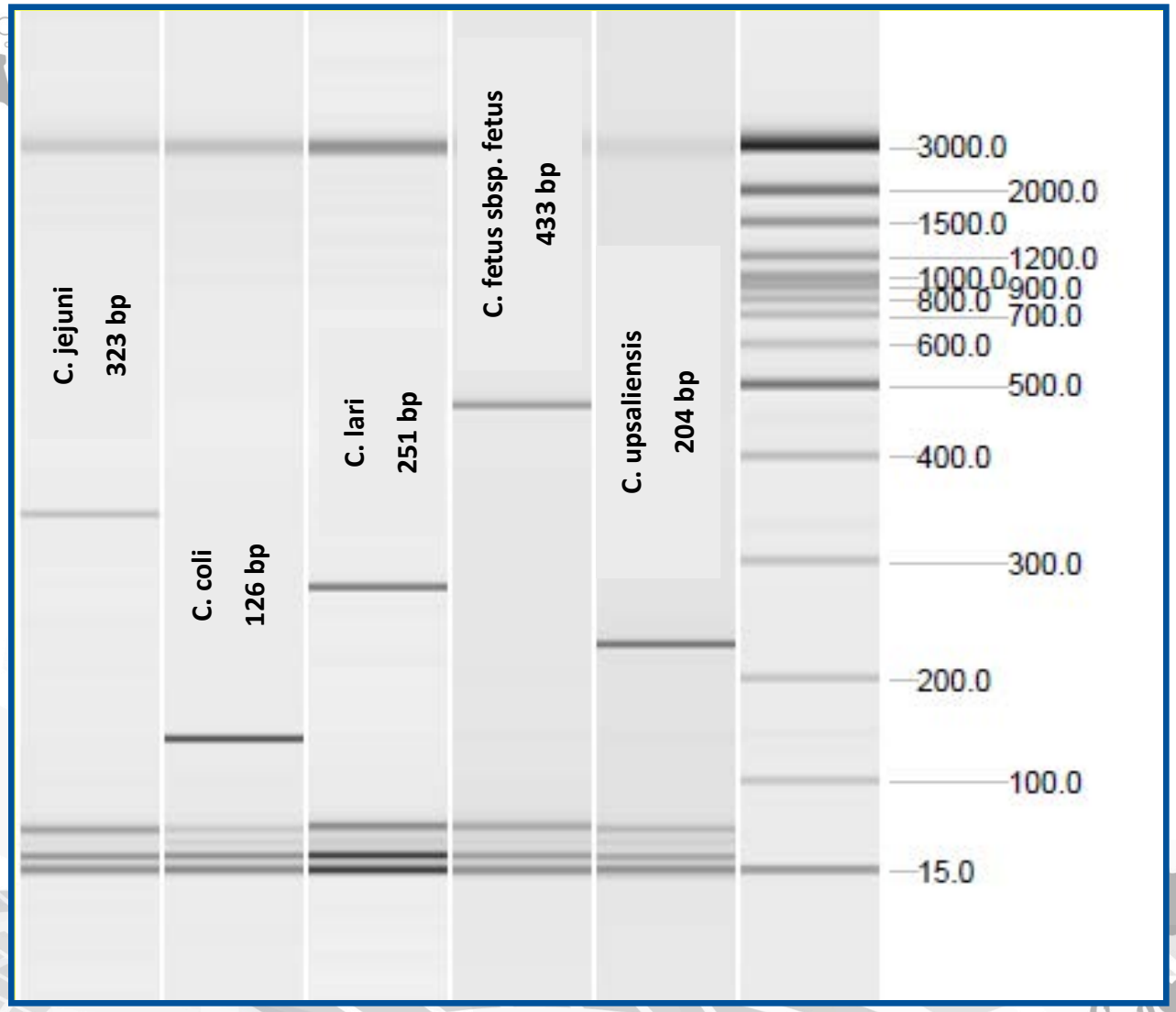
- Helicobacter

- Arcobacter

Marshall et al., 1999

Metodi

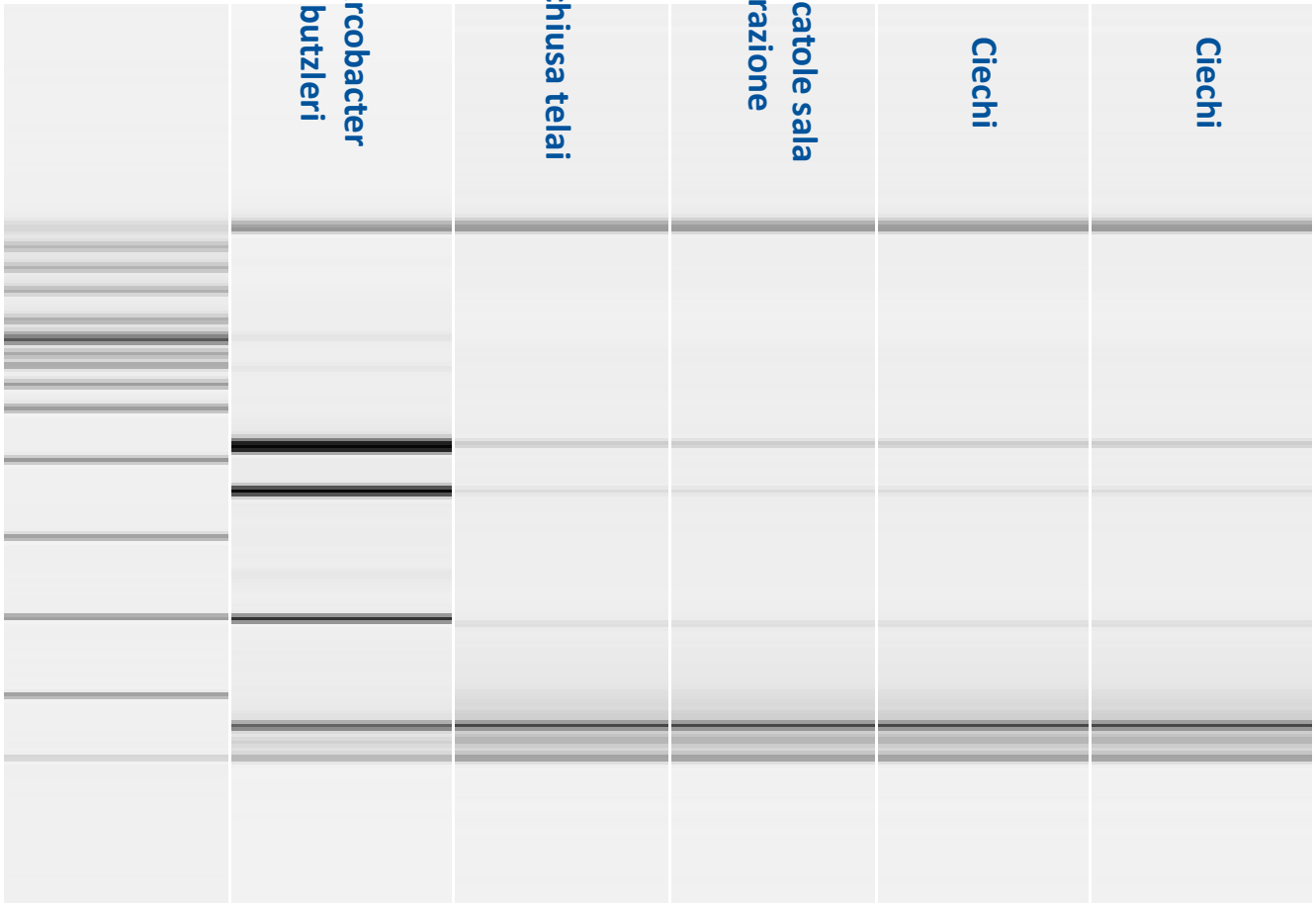
PCR multiplex: identificativa delle diverse specie di *Campylobacter* termotolleranti



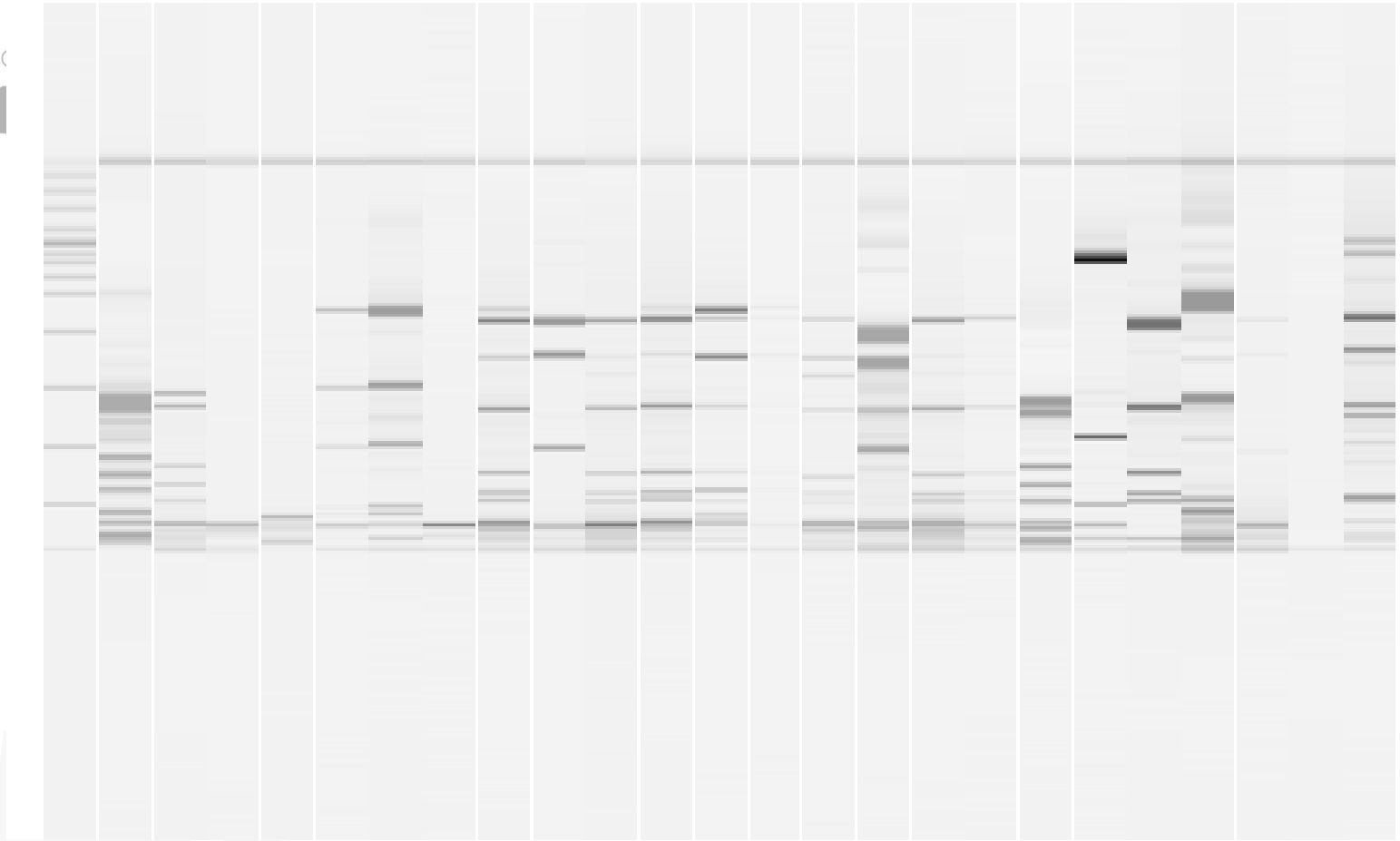
Wang et al., 2002

Incubatoio

Negatività per *Campylobacter*, ma positività per la famiglia *Campylobacteriaceae*



Allevamento



Insetti, acqua di fossato

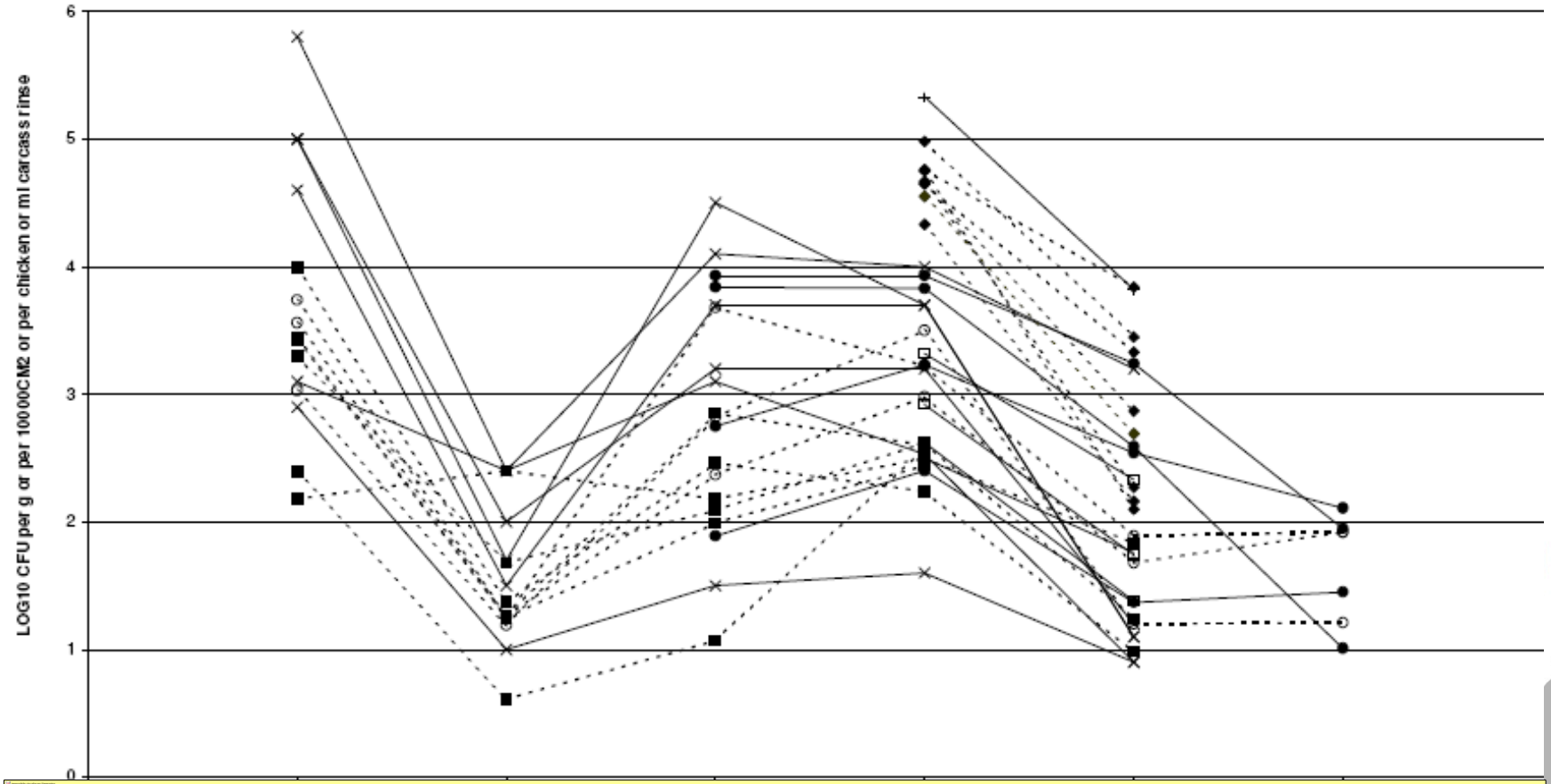
Risultati

Positività: allevamento-mattatoio

Tamponi cloacali polli in uscita dall’ allevamento

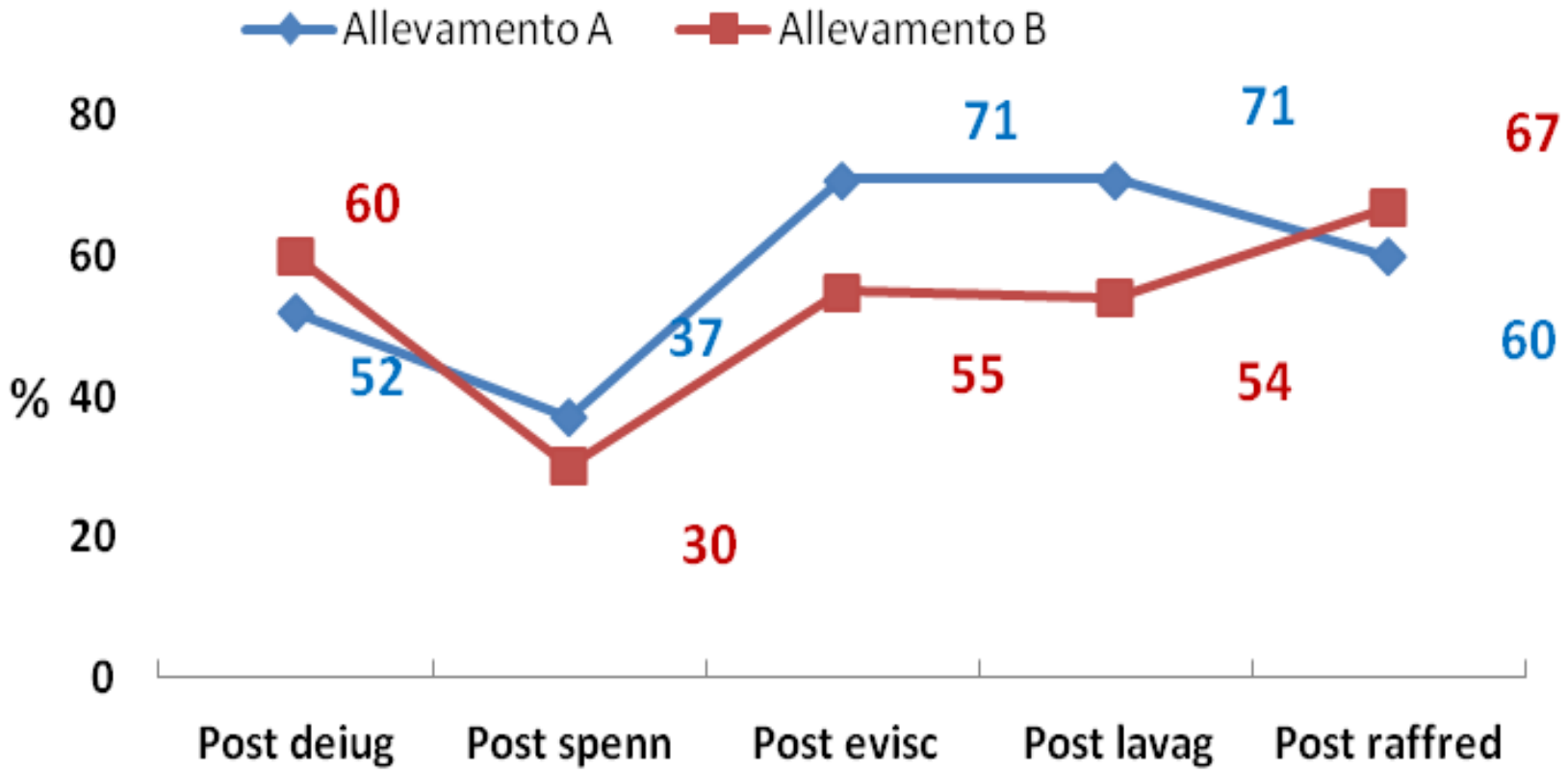
Campioni prelevati nelle varie fasi di macellazione

Contaminazione da *Campylobacter* sulle carcasse nelle varie fasi di macellazione.



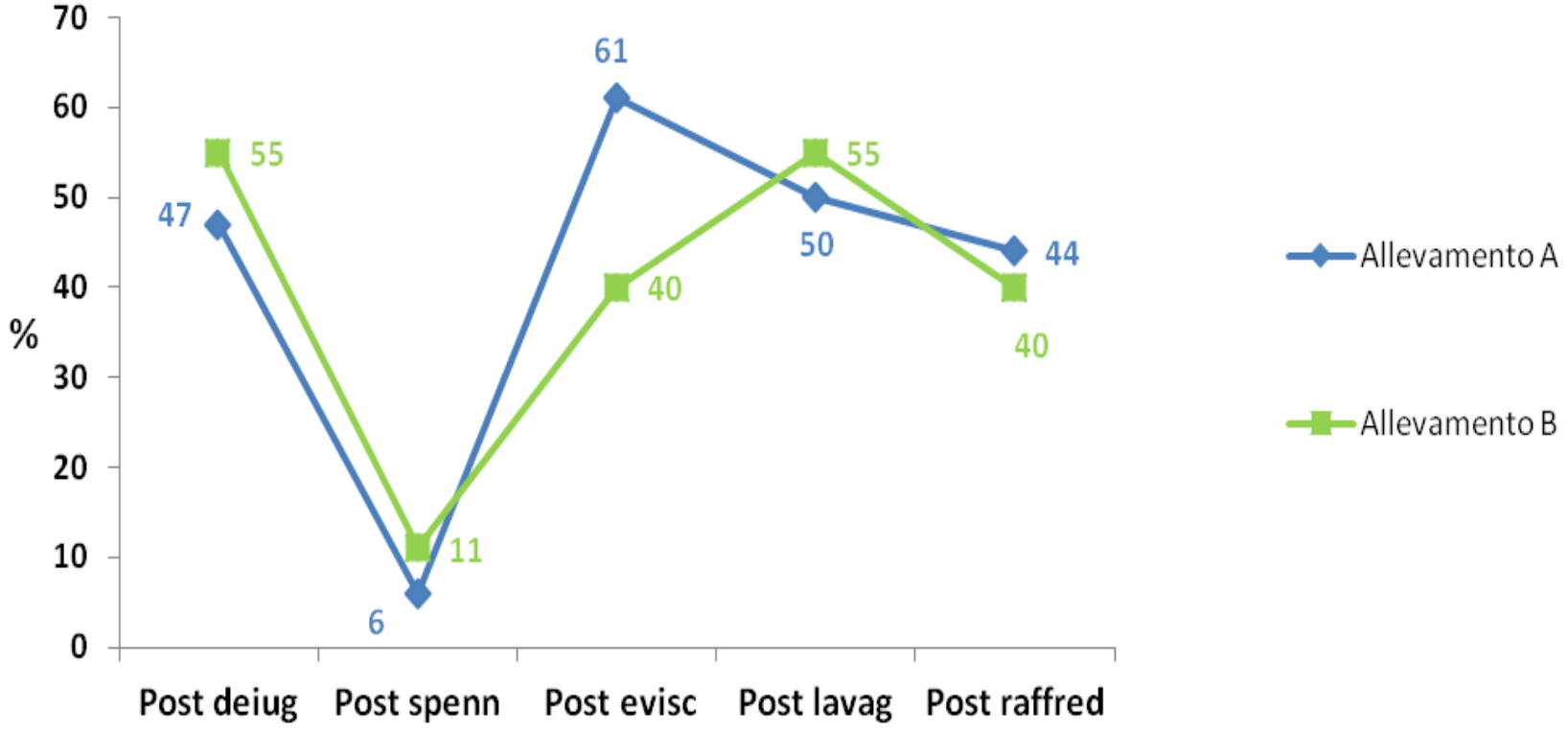
IZSAM G.CAPORALE
TERAMO

Prevalenze nelle varie fasi di macellazione



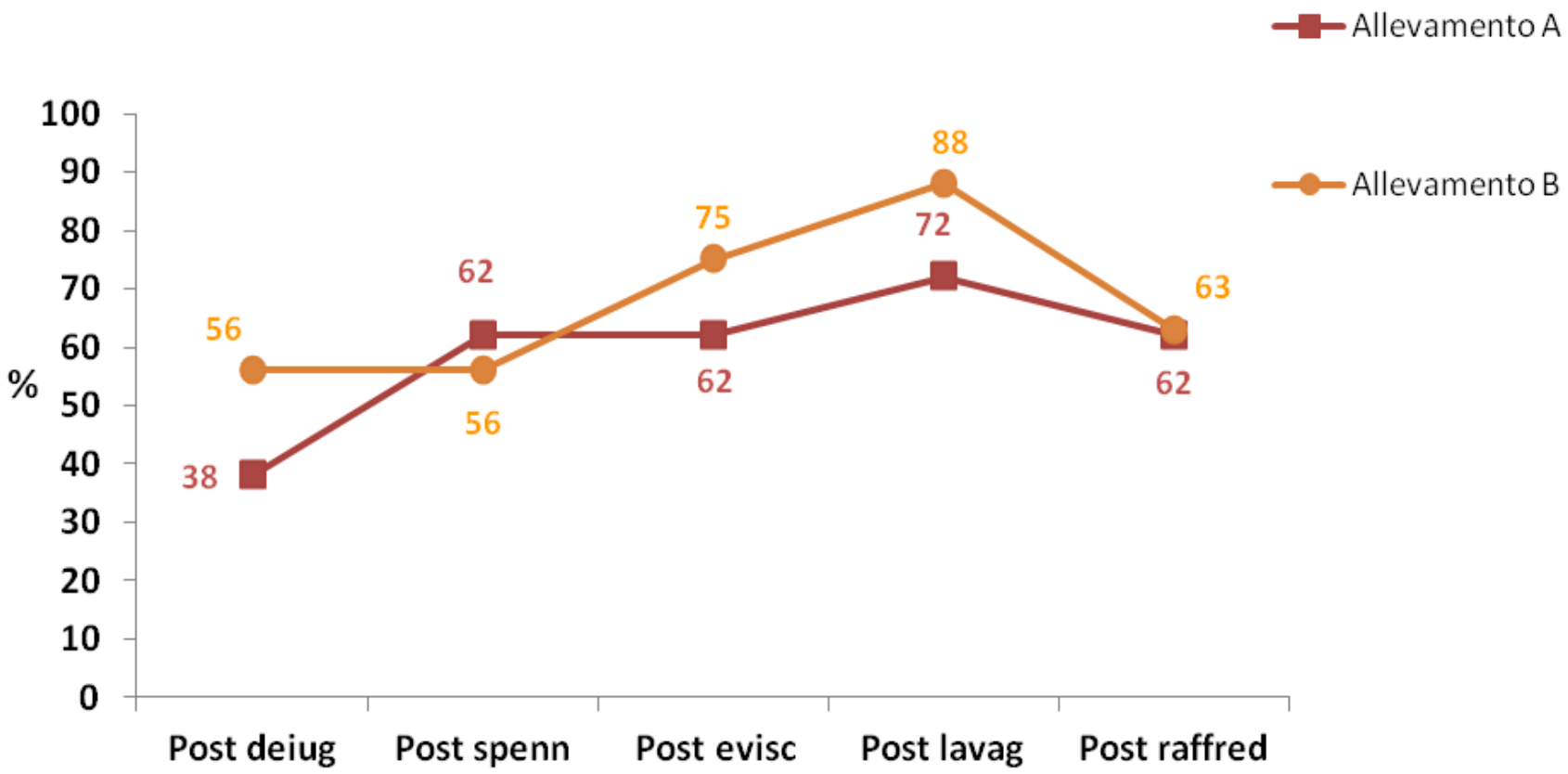
IZSAM G.CAPORALE
TERAMO

Confronto prevalenze cute stagione estiva



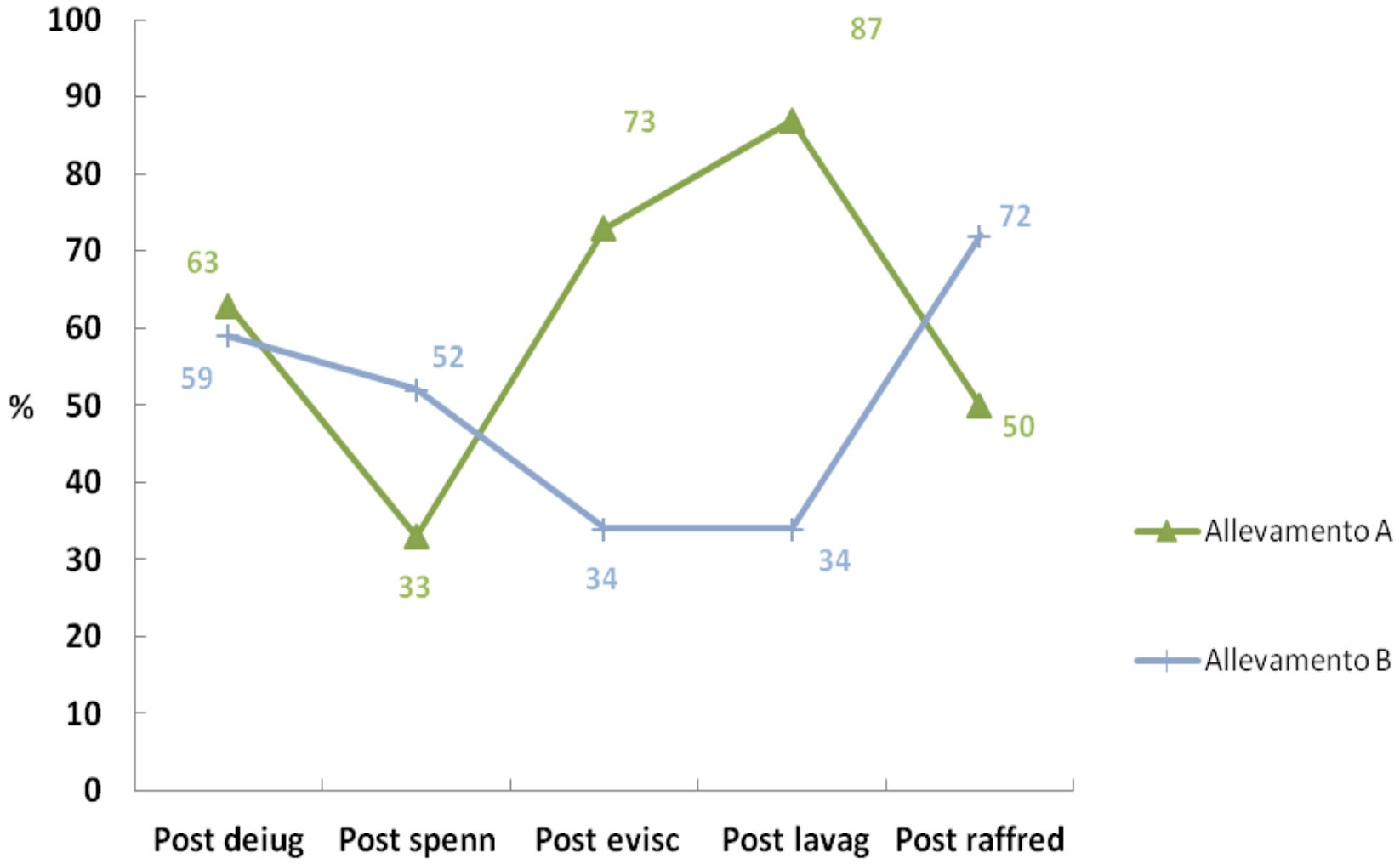
IZSAM G.CAPORALE
TERAMO

Confronto prevalenze cute stagione autunnale



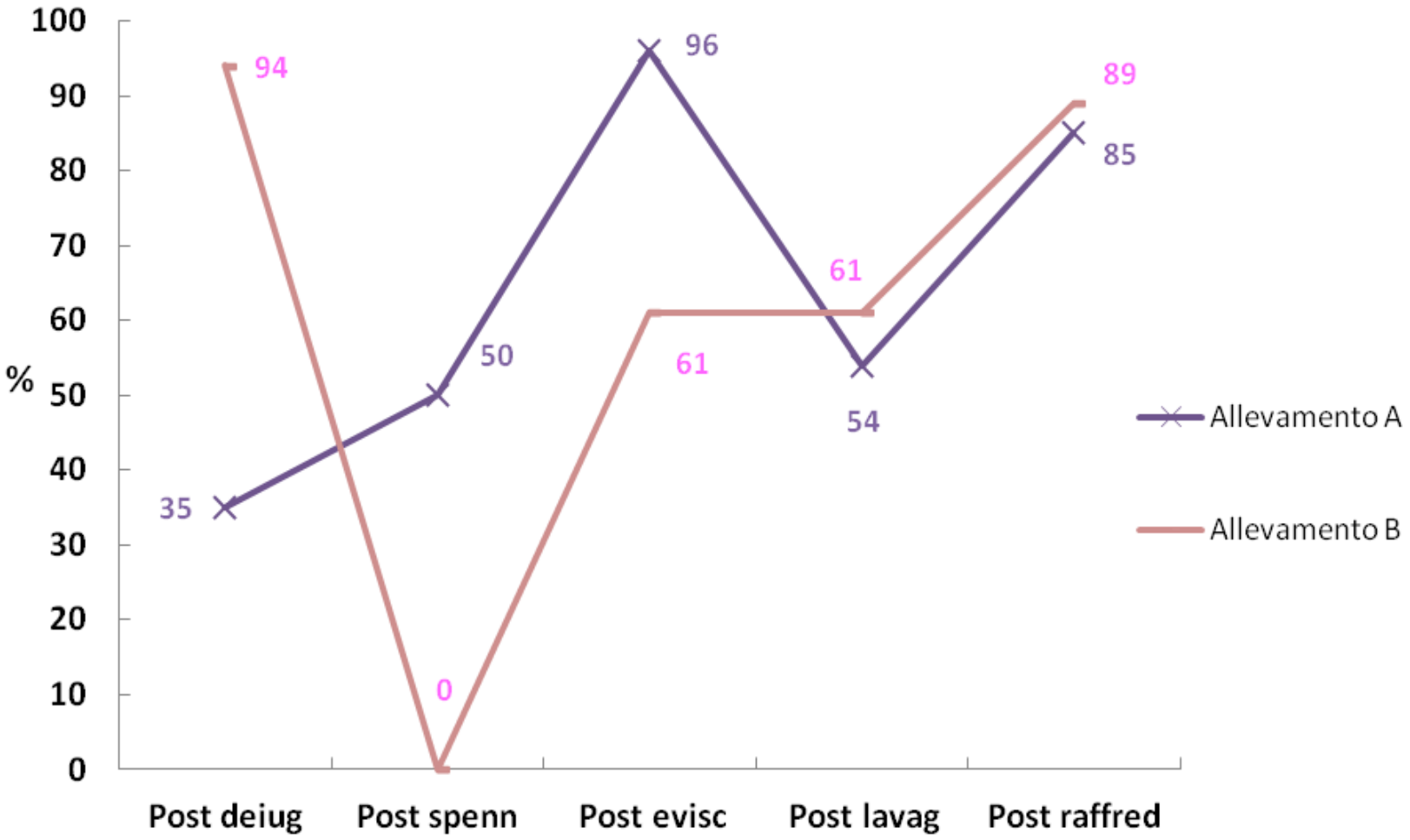
IZSAM G.CAPORALE
TERAMO

Confronto prevalenze cute stagione invernale

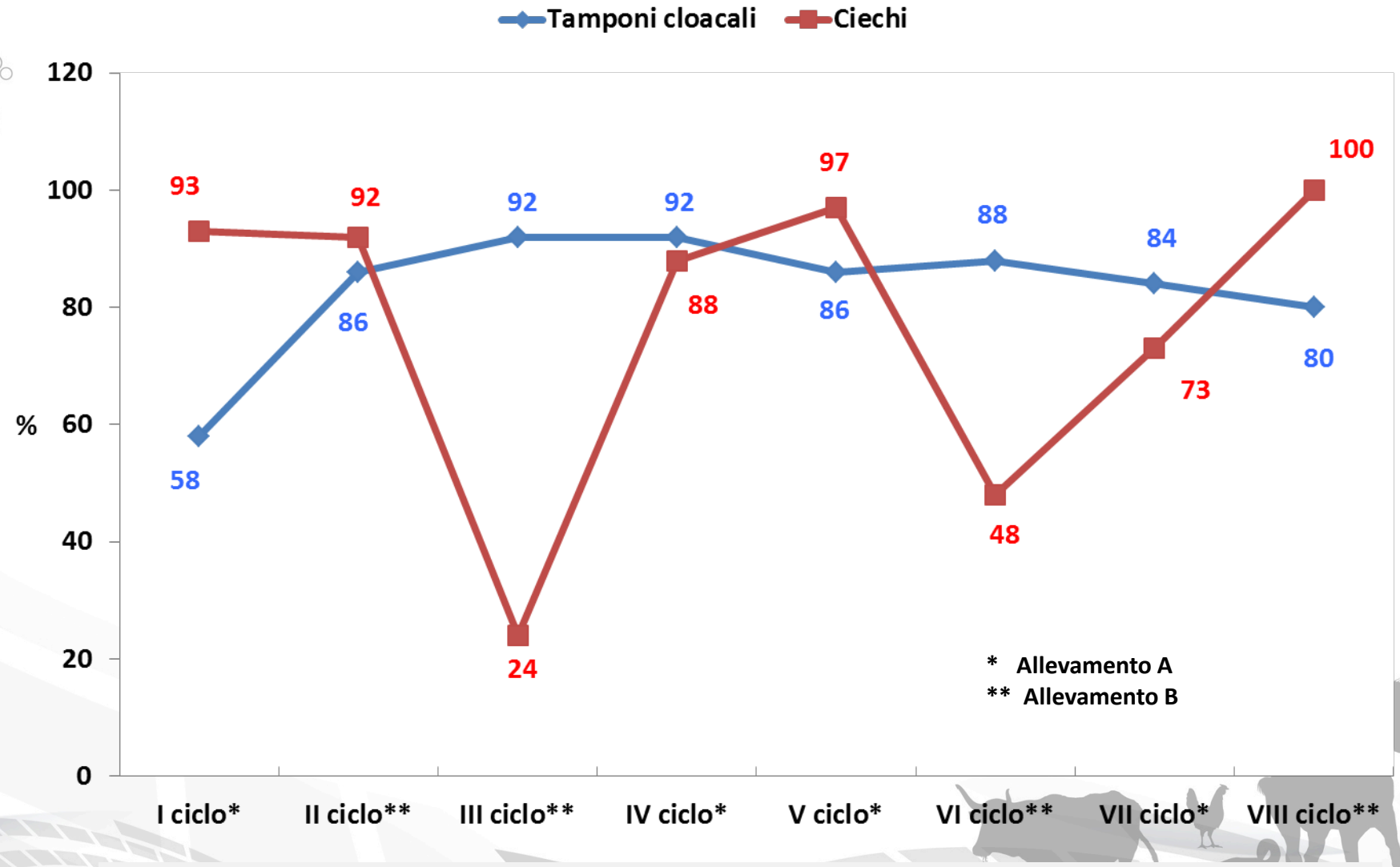


IZSAM G.CAPORALE
TERAMO

Confronto prevalenze cute stagione primaverile



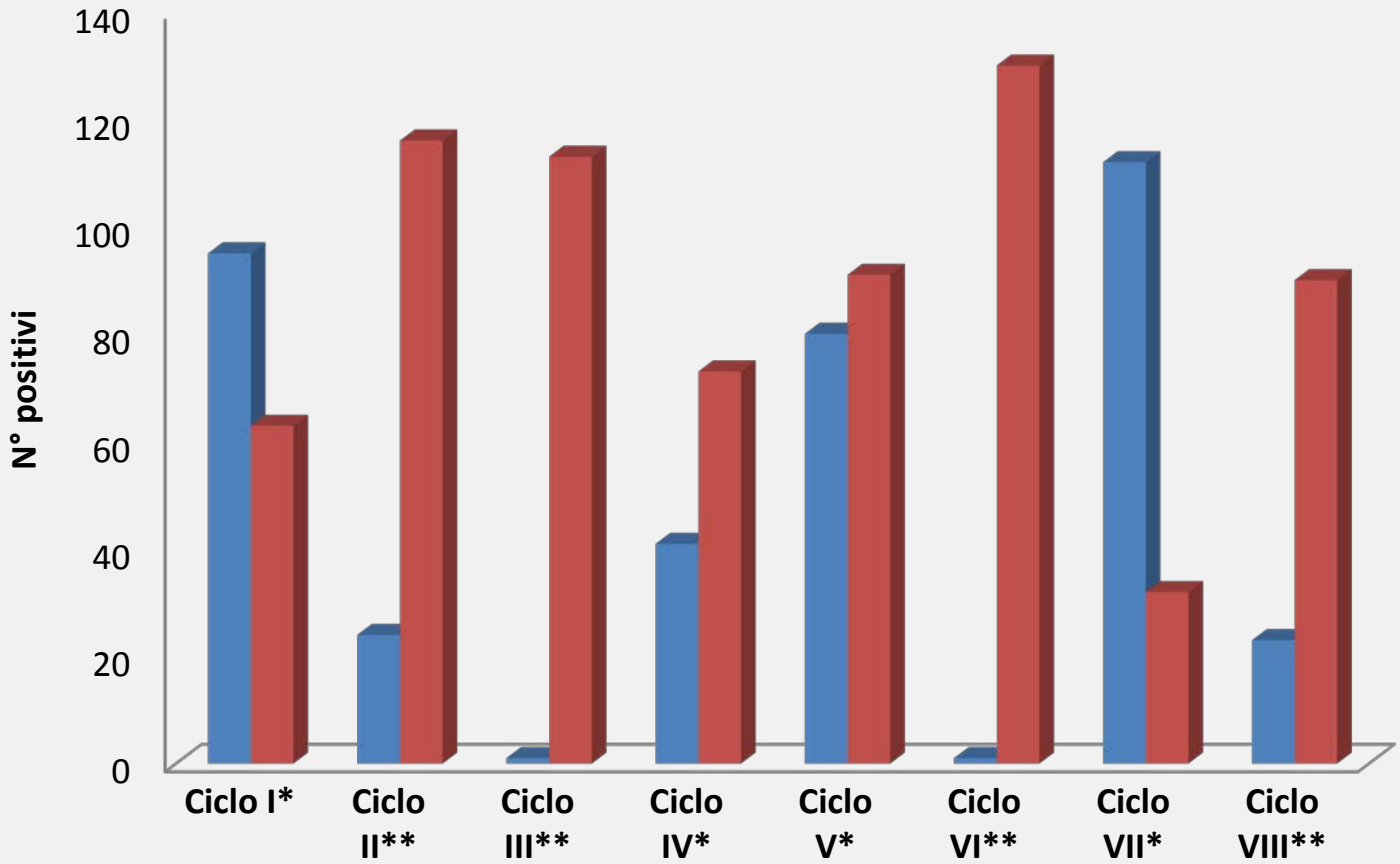
Prevalenze in ciechi e tamponi cloacali



Estate Autunno Inverno Primavera

Presenza del *Campylobacter* nei vari cicli di campionamento

* Allevamento A
** Allevamento B

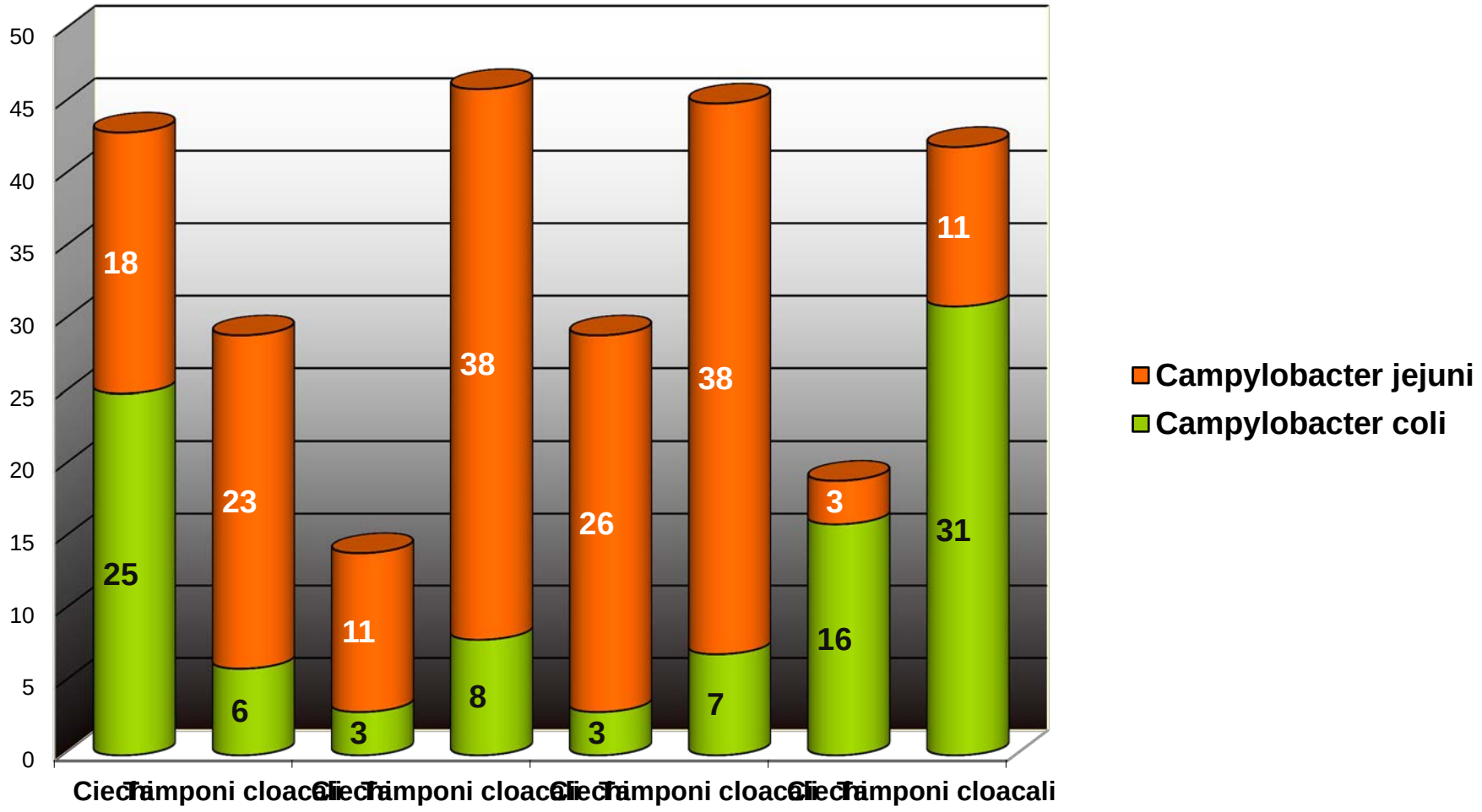


	Ciclo I*	Ciclo II**	Ciclo III**	Ciclo IV*	Ciclo V*	Ciclo VI**	Ciclo VII*	Ciclo VIII**
Campylobacter coli	95	24	1	41	80	1	112	23
Campylobacter jejuni	63	116	113	73	91	130	32	90

IZSAM G.CAPORALE TERAMO

Inverno

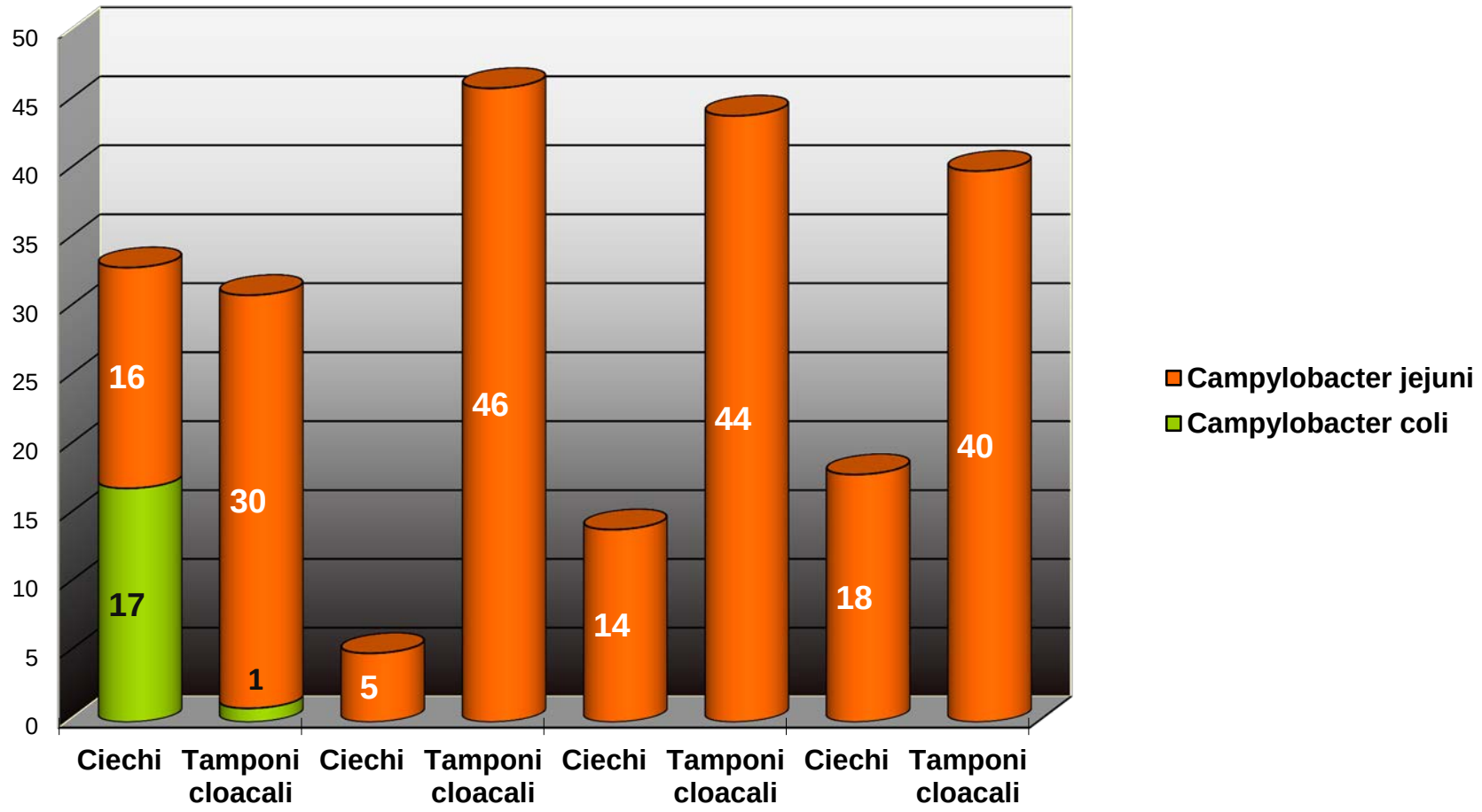
Distribuzione di Campylobacter in ciechi e tamponi cloacali (Allevamento A)



Estate Autunno Inverno Primavera

IZSAM G.CAPORALE TERAMO

Distribuzione di Campylobacter in ciechi e tamponi cloacali (Allevamento B)



Estate Autunno Inverno Primavera

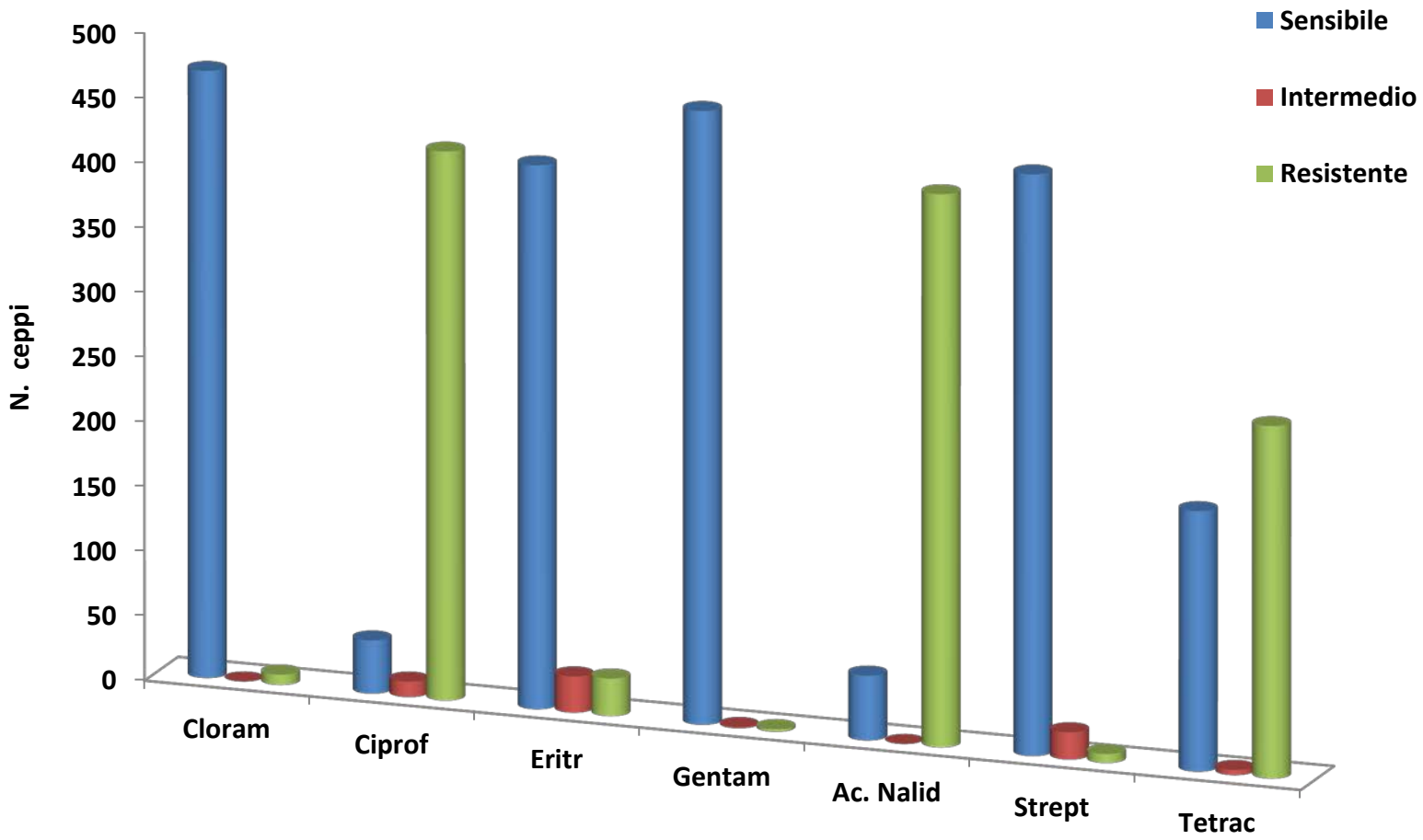
Tamponi ambientali effettuati al mattatoio

		Deiugulazione	Spennatura		Eviscerazione		Lavaggio		Raffreddamento	
		Guidovie	Macch. spenn.	Macch. taglia ano	Macch eviscer.	Macch. dilata ali	Bocch. di lavaggio	Tunnel di lavaggio	Guidovie	Superfici appoggio
Estate	I* ciclo									
	II** ciclo									
Autunno	III** ciclo	*C. coli*								
	IV* ciclo			*C. coli*	*C. coli*		*C. coli*		*C. coli*	
Inverno	V* ciclo									
	VI** ciclo									
Primavera	VII* ciclo								*C. coli*	
	VIII** ciclo									

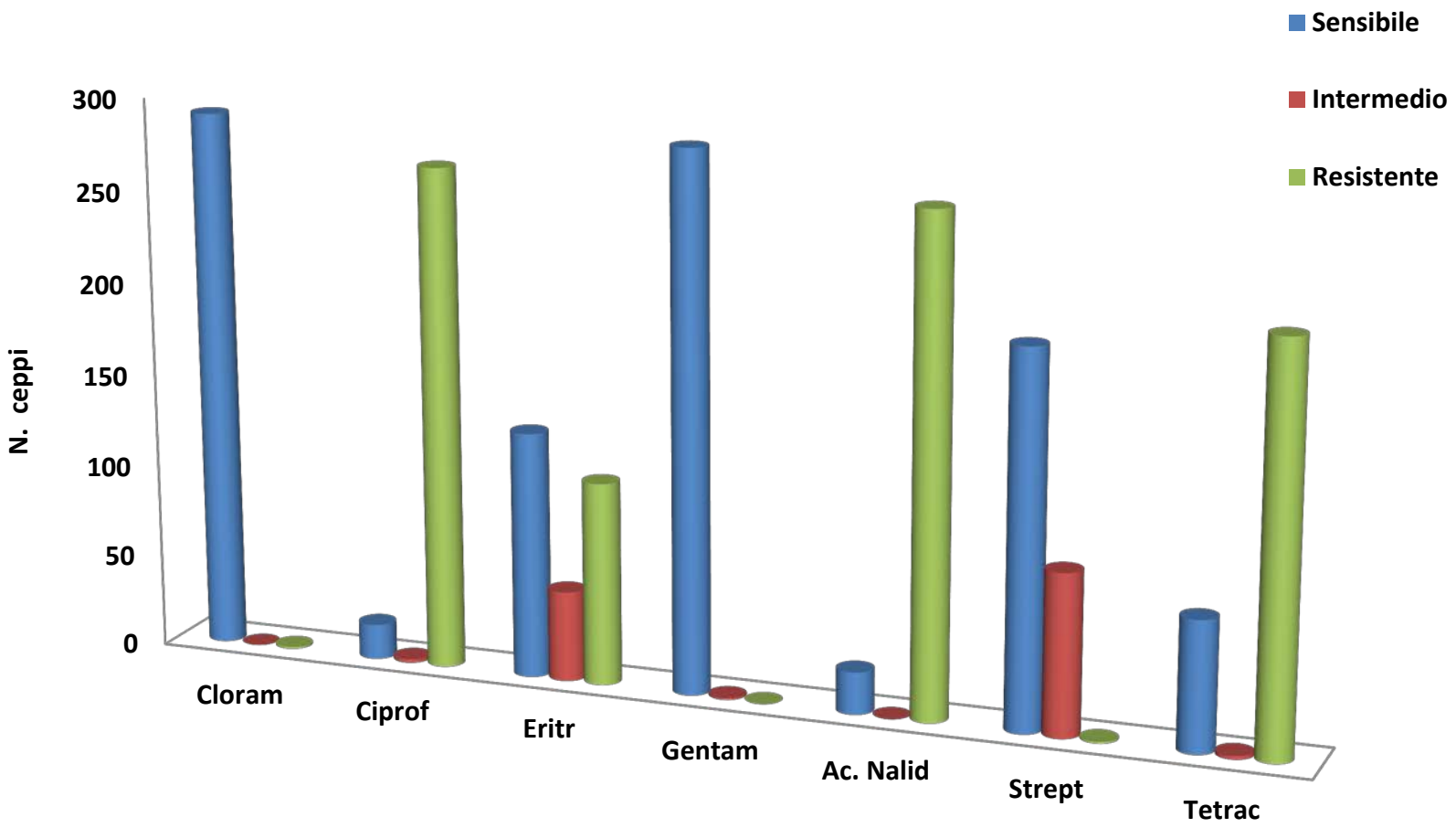
*Meschino di Atri **Montorio/Morro D'Oro

Resistenza del *Campylobacter coli* negli impianti di macellazione (Solow et al., 2003; Oyarzabal et al., 2010.)

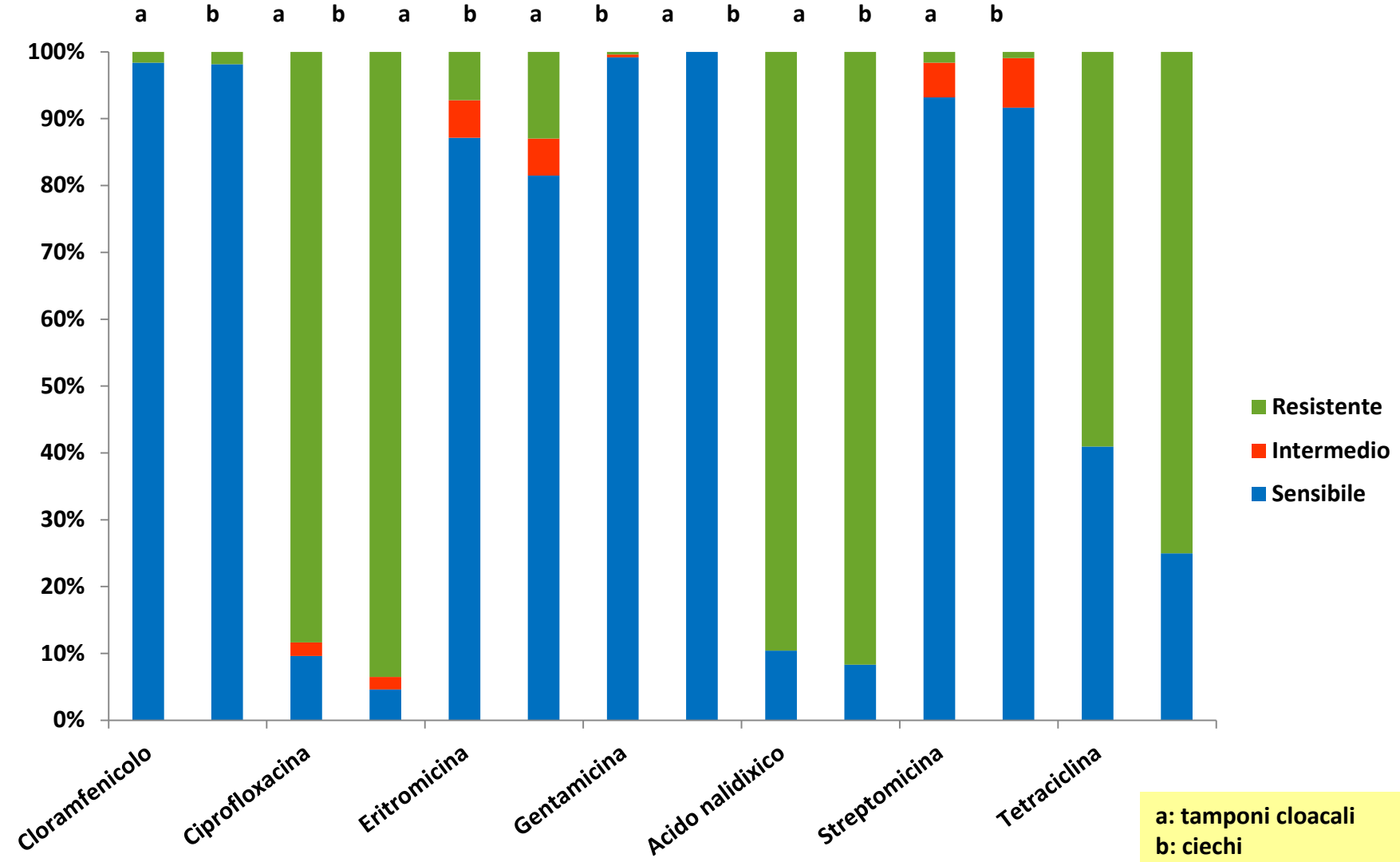
Andamento delle resistenze agli antibiotici nel *Campylobacter jejuni*



Andamento delle resistenze agli antibiotici nel *Campylobacter coli*

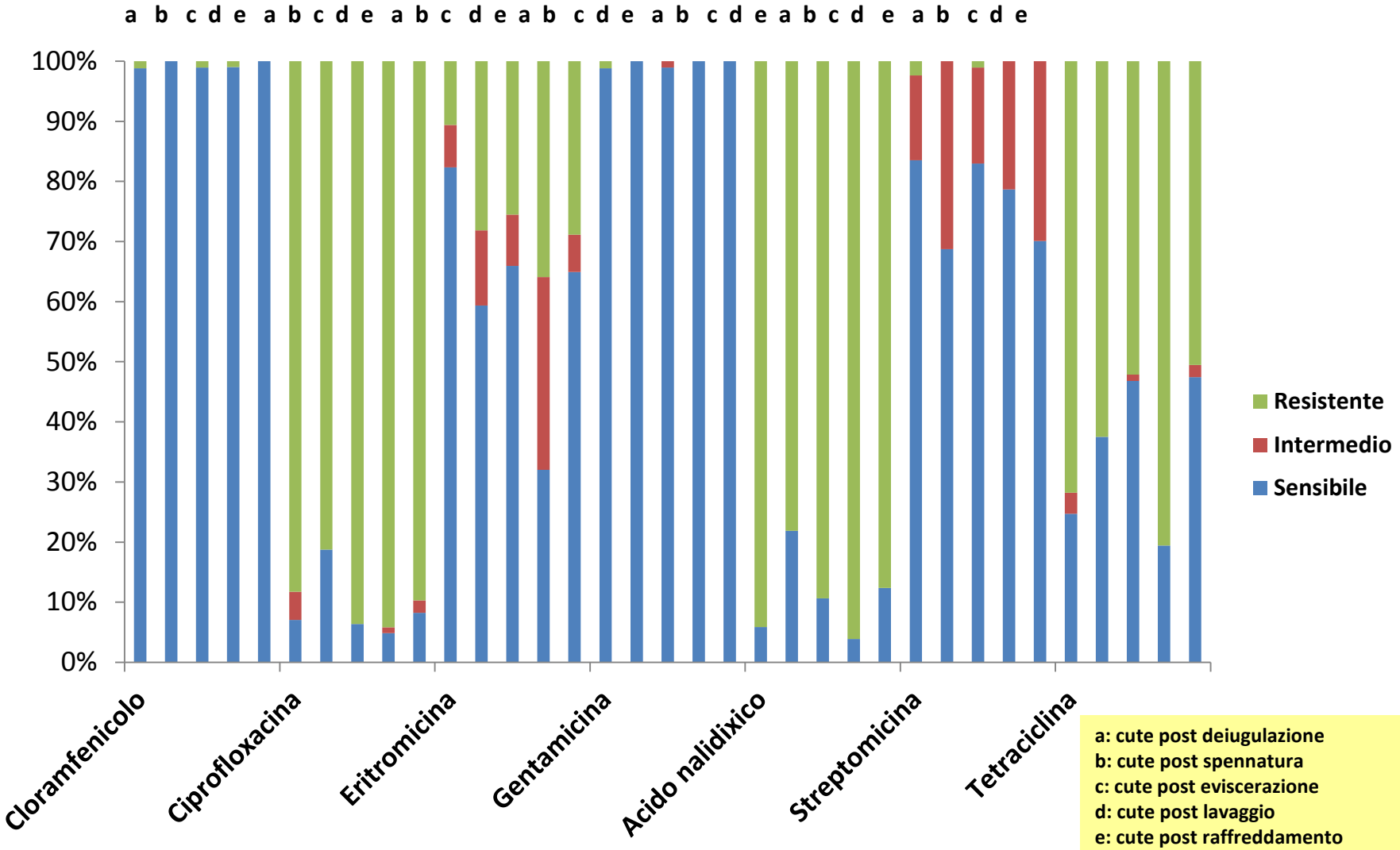


Confronto della resistenza agli antimicrobici in tamponi cloacali e ciechi



a: tamponi cloacali
b: ciechi

Confronto della resistenza agli antimicrobici nella cute



a: cute post deiugulazione
b: cute post spennatura
c: cute post eviscerazione
d: cute post lavaggio
e: cute post raffreddamento

Sierotipizzazione

Campylobacter jejuni

Penner e Hennessy, 1980

Sierogruppo	Sierotipo	Numero ceppi (valore %)
A	HS: 1, 44	45 (11.8)
C	HS: 3	61 (15)
D	HS: 4, 13, 16, 43, 50	55 (14.5)
E	HS: 5	1 (0.3)
I	HS: 10	1 (0.3)
J	HS: 11	1 (0.3)
L	HS: 15	84 (21)
O	HS: 19	1 (0.3)
R	HS: 23,36,53	1 (0.3)
V	HS: 32	1 (0.3)
Y	HS: 37	1 (0.3)
Z4	HS: 45	1 (0.3)
Z5	HS: 52	25 (6.5)
Z6	HS: 55	30 (7.7)
Z7	HS: 57	1 (0.3)
NT	Non tipizzabile	66 (17.2)
NC	Non classificabile	7 (1.8)

IZSAM G.CAPORALE TERAMO

TECNICHE DI BIOLOGIA MOLECOLARE UTILIZZATE

PCR

PFGE

SEQUENCING

MLST

Seq: Fla-A

PFGE: distribuzione delle popolazioni negli allevamenti

Allevamento A	Allevamento B
P2J	P1J
P3J	P2J
P6J	P4J
P2C	P7J
P3C	P8J
P6C	P9J
P7C	P10J
	P4C

PFGE

- Rilevate 12 popolazioni clonali per C. jejuni e 7 per C. coli.
- Evidenziate popolazioni caratteristiche per allevamento e cicli di campionamento.
- Evidenziati ceppi clonali in campioni prelevati in stagioni differenti e da matrici differenti, mettendo così in risalto **l'adattamento della popolazione all'ambiente dell'allevamento piuttosto che alla stagionalità.**

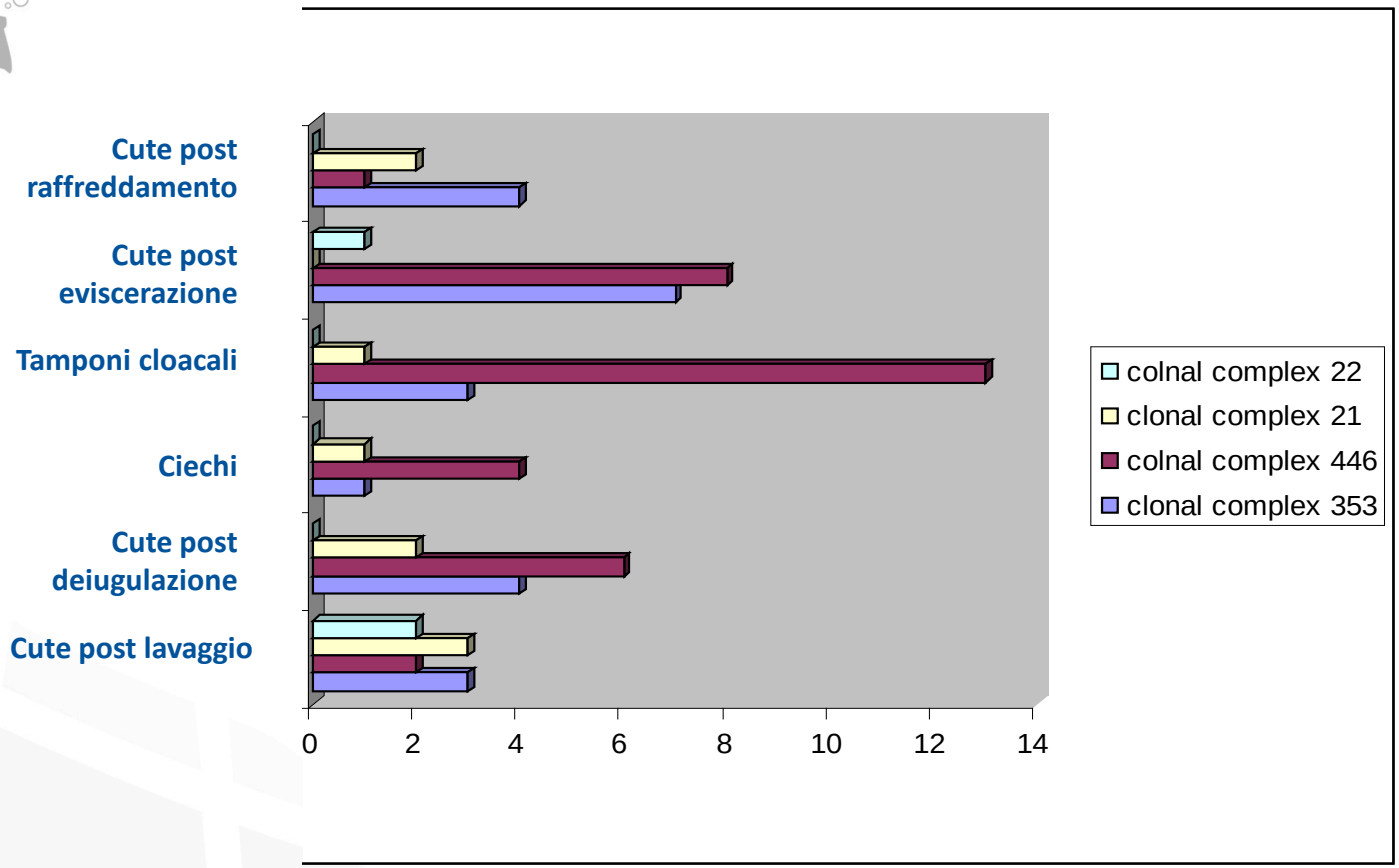
19/09/2011	cute post eviscerazi.	DBDS16.0006	DBDA20.0001
19/09/2011	cute post eviscerazi.	DBDS16.0006	DBDA20.0001
19/09/2011	cute post raffredda.	DBDS16.0006	DBDA20.0002
19/09/2011	Collo	DBDS16.0006	DBDA20.0001
19/09/2011	cute post-lavaggio	DBDS16.0006	DBDA20.0001
19/09/2011	Tamponi cloacali	DBDS16.0006	DBDA20.0007
19/09/2011	cute post eviscerazi.	DBDS16.0006	DBDA20.0001
12/12/2011	Tamponi cloacali	DBDS16.0006	DBDA20.0001
12/12/2011	Collo	DBDS16.0006	DBDA20.0001
12/12/2011	Tamponi cloacali	DBDS16.0006	DBDA20.0001
12/12/2011	Tamponi cloacali	DBDS16.0006	DBDA20.0001
12/12/2011	Collo	DBDS16.0006	DBDA20.0001
19/09/2011	cute post-lavaggio	DBDS16.0006	DBDA20.0038
12/12/2011	Collo	DBDS16.0006	DBDA20.0006
19/09/2011	Collo	DBDS16.0006	DBDA20.0004
19/09/2011	Ciechi	DBDS16.0006	DBDA20.0001
12/12/2011	Tamponi cloacali	DBDS16.0006	DBDA20.0001
12/12/2011	Ciechi	DBDS16.0006	DBDA20.0028
19/09/2011	cute post raffredda.	DBDS16.0006	DBDA20.0008
19/09/2011	Tamponi cloacali	DBDS16.0006	DBDA20.0006

Inoltre...

Confrontando i ceppi provenienti dai diversi campionamenti è stato possibile correlare gli isolati da pollo con quelli di altri volatili e con i ceppi di origine umana pervenuti nello stesso periodo al LNRC, **evidenziando anche casi di clonalità.**

MLST

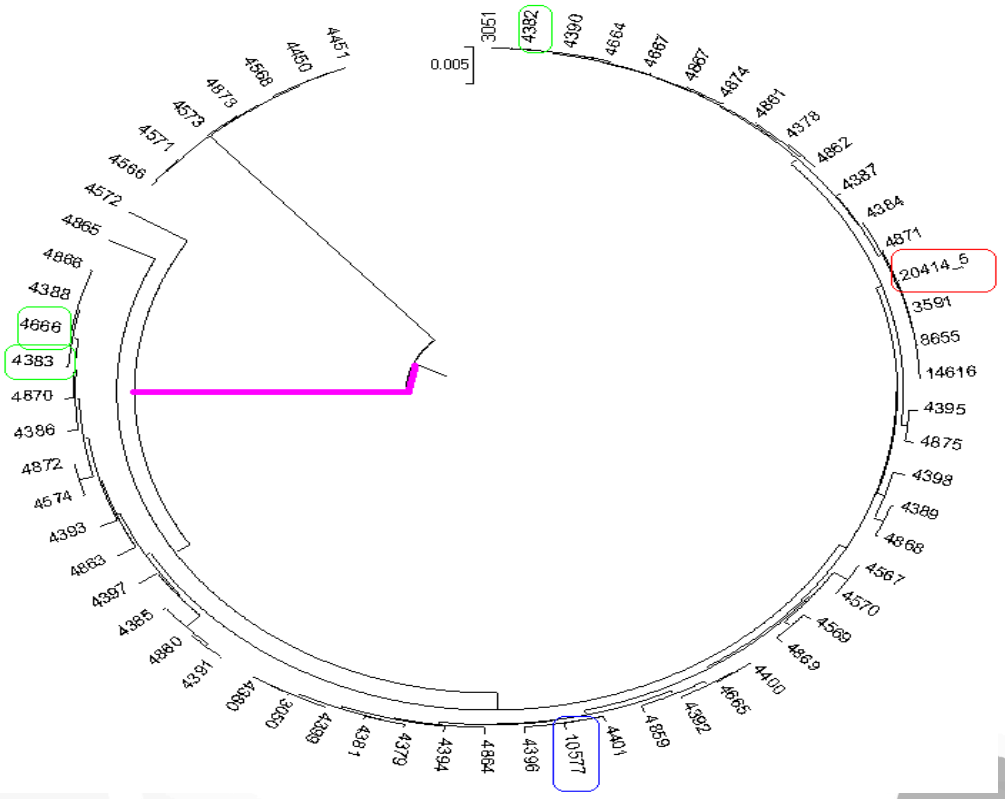
70 ceppi di Campylobacter jejuni, campionamento estivo (allevamento B)



http://pubmlst.org/perl/bigsdb/bigsdb.pl?db=pubmlst_campylobacter_isolates&page=listQuery

MLST

Dendrogramma della popolazione clonal complex 353, in rosso una campione del progetto, in blu un campione proveniente dall' Italia isolato in pollo ed in verde campioni provenienti dall' Italia isolati da gastroenteriti umane.

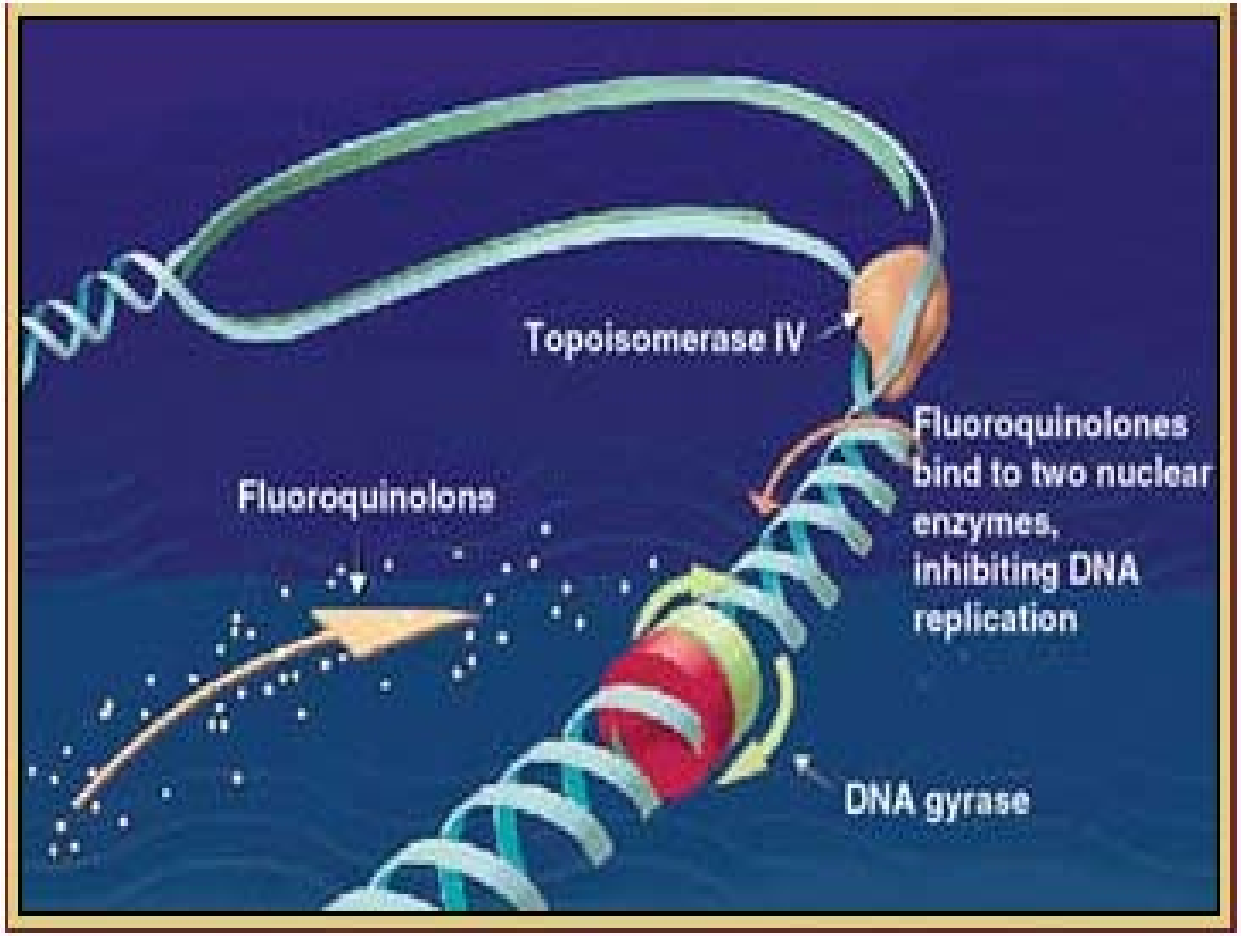


flaA-SVR

-Alleli tipici del ciclo di campionamento in esame, indipendentemente dalla matrice di origine.

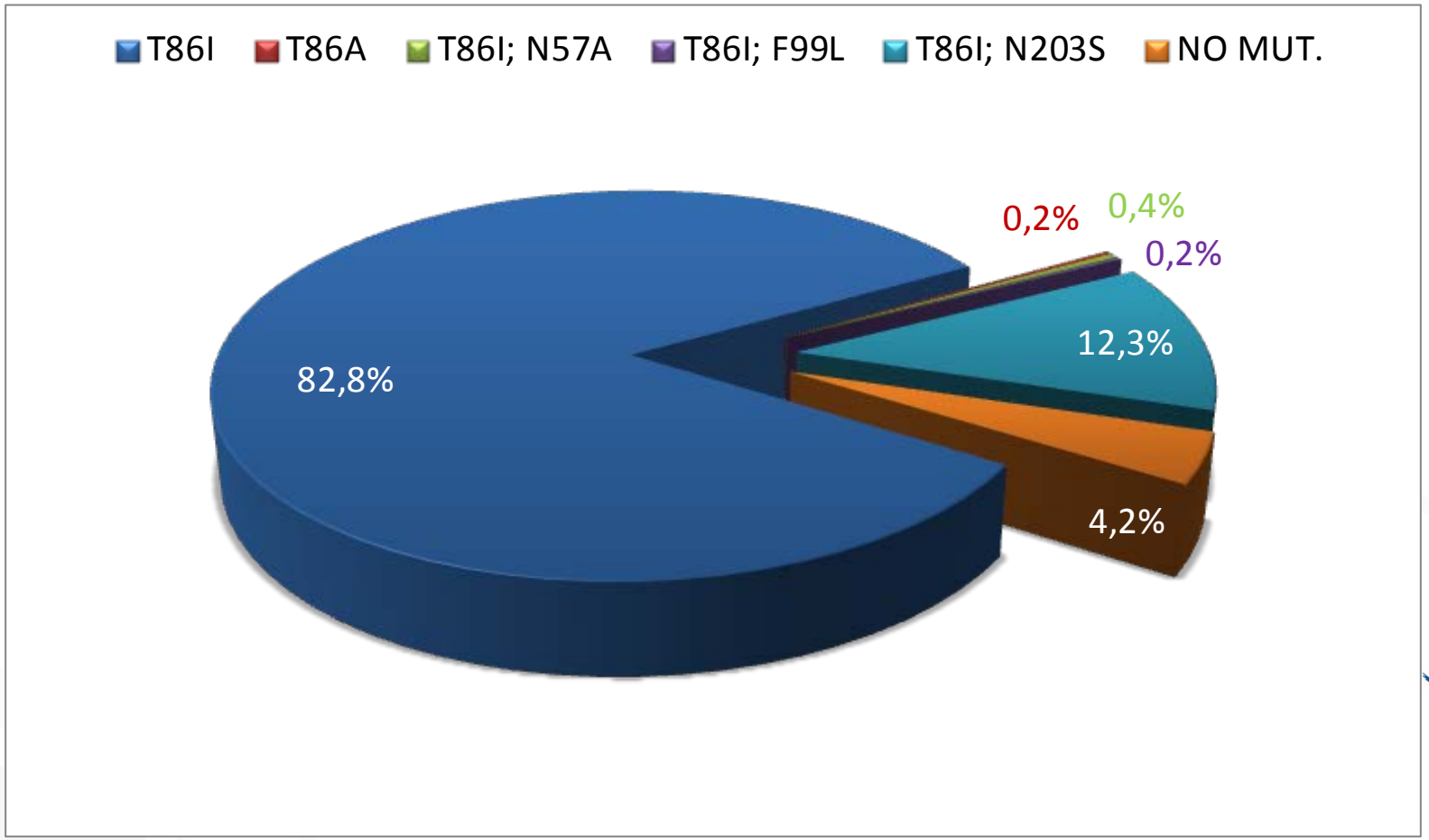
-Alleli presenti nelle 4 stagioni di campionamento all'interno dello stesso allevamento: persistenza di quel tipo di *Campylobacter* all'interno dello stesso allevamento.

Resistenza ai chinoloni e fluorochinoloni



- Sequenziamento di *gyrA* codificante per subunità A della DNA girasi.
- Mutazioni a carico di QRDR (quinolone-resistence-determining region).

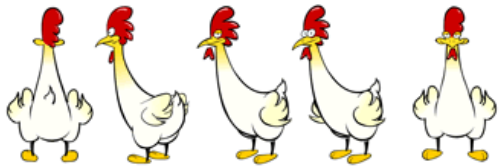
Distribuzione mutazioni *gyrA*



Sequenziati 505 ceppi resistenti a Ciprofloxacina e/o Acido Nalidixico

T: treonina; I: isoleucina; A: alanina; F: fenilalanina; L: leucina; N: asparagina; S: serina

Multiresistenza in *Campylobacter* di origine avicola



N° antibiotici	Profilo	*C. jejuni*	*C. coli*	Percentuale
7	CCipEGNaST	3	0	0,2%
6	CCipENaST	1	2	0,2%
	CipEGNaST	0	1	0,1%
5	CCipENaT	1	2	0,2%
	CENaST	0	3	0,2%
	CipENaST	2	8	0,8%
4	CipENaT	30	164	14,7%
	ENaSTe	0	1	0,1%
	CipNaST	3	3	0,5%
	CcipNaT	3	0	0,2%
	CipEST	0	1	0,1%
	TOT ceppi	43	185	17,3%

C: cloramfenicolo; Cip: ciprofloxacina; E: eritromicina; G: gentamicina; Na: acido nalidixico; S: streptomicina; T: tetraciclina
Dati su 1317 ceppi esaminati.

Conclusioni e prospettive future……

1) Esigenza di indagare in maniera puntuale nell'ambiente di allevamento in modo da poter individuare le modalità di ingresso del *Campylobacter* nella filiera (operatori, agenti infestanti).

2) MLST e PFGE hanno rivelato un'ampia diffusione di diversi genotipi di *Campylobacter* suggerendo l'esistenza di multiple fonti di infezioni. La possibilità di rilevare la clonalità dei ceppi con queste metodiche molecolari ha anche permesso di valutare quali siano le fonti d'infezione più comuni per l'uomo.

3) La valutazione della diversità genetica all'interno dei Campylobacter è fondamentale per la nostra comprensione della epidemiologia di questo batterio.

4) Ulteriori analisi di isolati da varie fonti permetterà grandi progressi nella comprensione della loro epidemiologia e struttura delle popolazioni di *Campylobacter* circolanti in Italia.

IZSAM G.CAPORALE TERAMO

GRAZIE AL TEAM CAMPY

IZSAM G.CAPORALE TERAMO

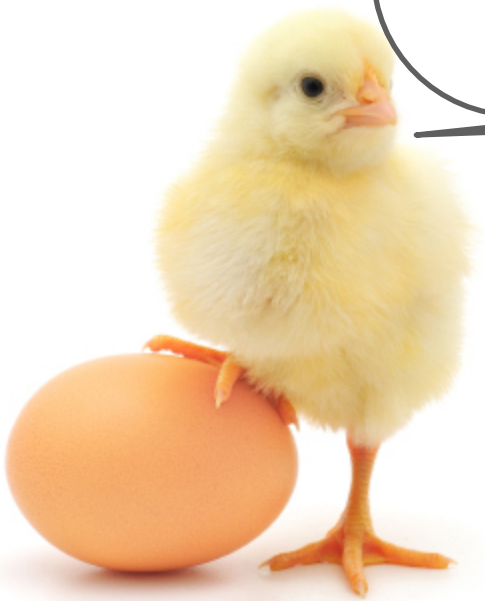
Grazie particolare a...

IGIENE ALIMENTI SEDE CENTRALE

E SEZIONI

Vincenza Prencipe, Luigi Iannetti, Sperandii Annafranca, Salvatore Antoci, Gino Santarelli, Romina Romantini, Diana Neri, Roberta D' Aurelio, Meri Di Leonardo,

Giorgio Iannitto, Margherita Perilli

COVEPI

Paolo Calistri, Simona Iannetti