

Di Giannatale Elisabetta
LNR Campylobacter



IZSAM G. CAPORALE
TERAMO

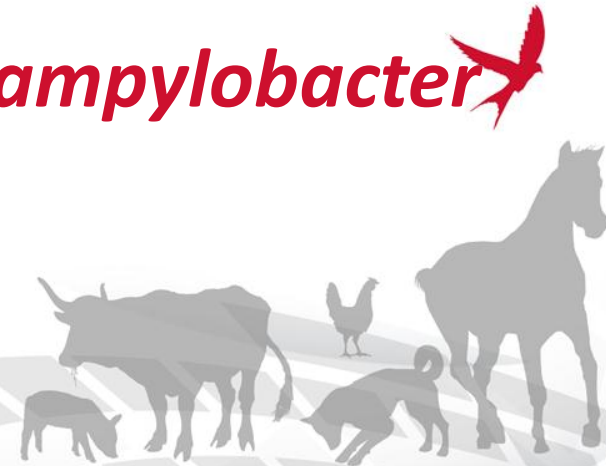
 *Campylobacter*
Laboratorio Nazionale di Riferimento



b2201277 [RM] © www.visualphotos.com

CHRO 2013 e workshop EU-RL *Campylobacter*

Teramo 11&12/12/2013

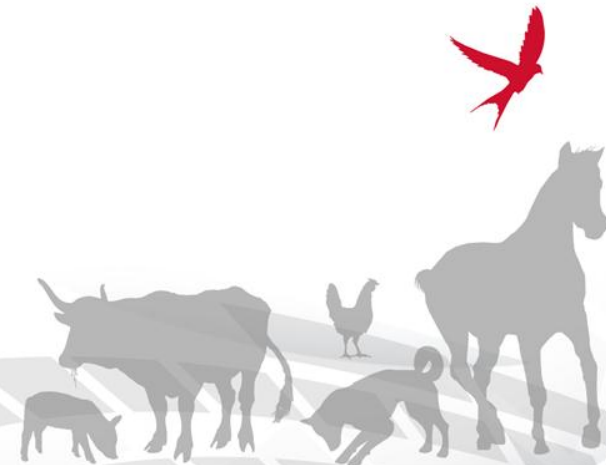




 *Campylobacter*
Laboratorio Nazionale di Riferimento

8° Workshop EU-RL – Aberdeen 19-20 September ,2013

CHRO 2013 International Workshop on Campylobacter, Helicobacter and Related Organisms. 15-19 September 2013, Aberdeen Exhibition and Conference Centre, Scotland, UK





19-20 settembre 2013: 8° Workshop EU-RL : Aberdeen, UK

 **Campylobacter**
Laboratorio Nazionale di Riferimento

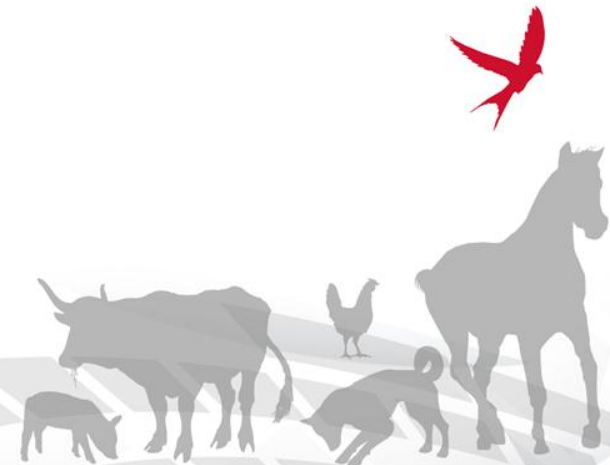


Staff EU-RL, 27 paesi membri + 4 paesi EU, European Food Safety Authority (EFSA), Center for Disease Control and Prevention (CDC).



Argomenti di discussione

- le attività di revisione delle norme ISO e della validazione
- attività sul *Campylobacter* in EU e a livello nazionale
- risultati dei RT 2013 (PT11 e PT12)





 *Campylobacter*
Laboratorio Nazionale di Riferimento

ISO revisione: ad *hoc* working group

Campylobacter

- 
- Belgio
 - Francia
 - **Italia**
 - Paesi Bassi
 - Spagna
 - Svezia
 - Tailandia
 - Inghilterra



Isolamento: ISO 10272-Parte 1 A

Ricerca mediante arricchimento in prodotti con basso numero di *Campylobacter* e bassa flora contaminante (es. prodotti cotti o congelati)



ISO 10272-1 corrente con utilizzo di brodo Bolton (4-6 h a 37°C e 40-48 ore a 41,5°C in microaerofilia).
Isolamento su mCCDA e un secondo terreno selettivo (con principio diverso da mCCDA)



Isolamento: ISO 10272-1B

a) Isolamento mediante arricchimento in prodotti con basso numero di *Campylobacter* e alta flora contaminante (es. carne macinata cruda e latte crudo) utilizzando brodo Preston (22-26 h a 41,5°C in microaerofilia e isolamento su mCCDA




Isolamento ISO 10272-1C

Isolamento per semina diretta in piastra per prodotti con alto numero di *Campylobacter* come feci, contenuto cecale, carne cruda di pollo (pelle del collo, carcassa). Isolamento diretto del campione o della sua diluizione iniziale su mCCDA.




Numerazione : ISO 10272-2



a) Al momento si ritiene non necessaria una revisione, e si accetta l'uso dell'mCCDA come medium selettivo. In conformità con la ISO 7128:2007, la semina delle diluizioni va fatta in singolo, in duplicato solo se si semina una sola diluizione. In presenza di bassi livelli di contaminazione la prima diluizione va seminata in triplicato (3mCCDA).



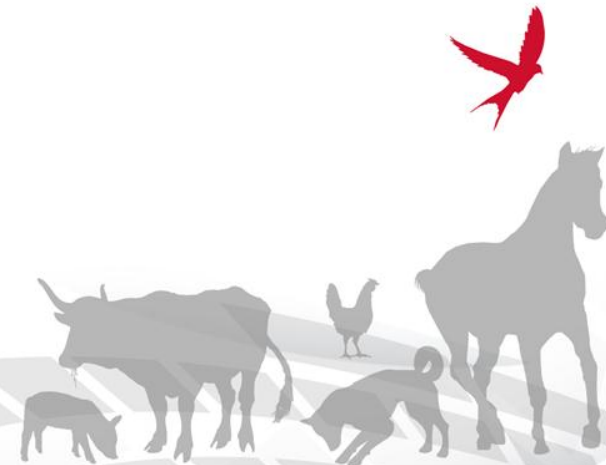
ISO 10272-3 e 10272-4



a) **Parte 3:** metodo semiquantitativo (pubblicato nel 2010) si è deciso di ritirare questa parte della norma in quanto questo metodo non è utilizzata

b) **Parte 4:** campioni dalla produzione primaria

Campioni dalla produzione primaria come feci o contenuto cecali sono stati ricompresi nella parte 1B e/o 1C.





 *Campylobacter*
Laboratorio Nazionale di Riferimento

Conferma: uguale per tutte le procedure

 a) Esame microscopico (direttamente da agar sangue dopo reisolamento)

- Ossidasi
- Assenza di crescita a 25°C

In alternativa :

- PCR
- Metodi sierologici

Metodi biochimici (catalasi, idrolisi dell'ippurato, indoxil acetato).





ISO validation studies


(“the CEN Mandate”)

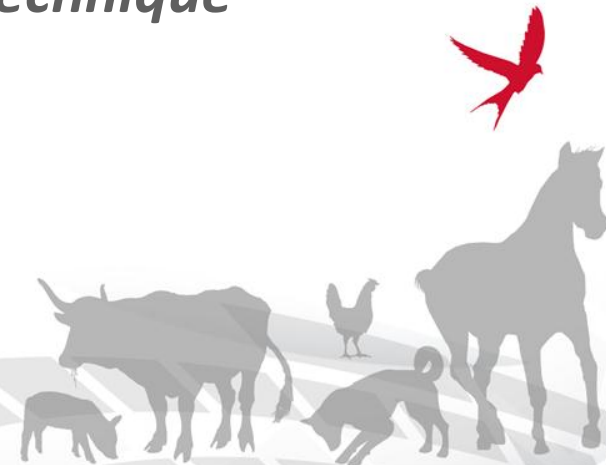
Wilma Jacobs-Reitsma, RIVM
Ida Jongenburger, NVWA

**EURL-Campylobacter Workshop, Aberdeen
19-9-2013**



Validazione dei metodi per Campylobacter

- 
1. EN-ISO 10272-1:2006, Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for detection and enumeration of *Campylobacter spp.* **Detection method : part (1A, 1B, 1C)**
 2. ISO-TS 10272-2:2006, Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for detection and enumeration of *Campylobacter spp.* **Part 2: Colony-count technique**



Protocollo per gli studi di validazione



a) studi interlaboratorio (NRL)

a) omogeneità e stabilità effettuata (EURL)

a) La valutazione statistica in accordo con la ISO 16140

a) Definite procedure per rendere omogenei i
comportamenti dei singoli laboratori



5 matrici x 15 lab in 11 paesi EU





mento

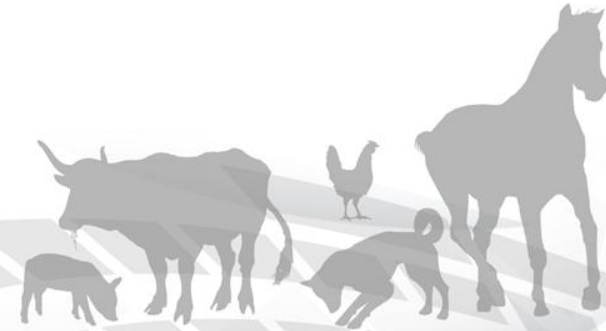


matrici	ceppi	Metodo di rilevamento
Carne congelata macinata (maiale/bovino)	C.jejuni ATCC 33559	1A (Bolton)
lattuga	C.jejuni ATCC 33291	1A (Bolton)
Latte crudo	C.jejuni ATCC 29428	1 B (Preston)
Pelle del collo di pollo	C.Coli ATCC 43478	1 B (Preston)
Materiale cecale broiler	C.jejuni DSM 24306	1 C (semina diretta su piastra)



Validazione: RT

- 
- I campioni sono stati inviati a novembre 2013
 - Stesso tempo di inizio prova
 - terreni, materiali e strumentazione dei laboratori
 - Partecipazione anche solo ad una parte dello studio 



ILS for validation of ISO 10272-1

15 laboratori (≥ 10 set di dati validi e necessari per le statistiche)

- campioni di 10 g (0,5 ml caeca) ;3 livelli di contaminazione: bianco +
 - Bassa carica, 5-10 ufc / campione
 - Alta carica 50-100 ufc /camp. (10^3 ufc / g caeca)
- 5 matrici diverse (applicazione orizzontale del metodo)
- Ogni laboratorio deve testare 24 campioni per matrice (120 per ILS)



ILS for validation of ISO 10272-2

- a) Almeno 12 laboratori (≥ 8 set di dati validi necessari per le statistiche)
- b) 4 livelli di contaminazione su campioni di 1 g (caeca) o 10 g (pelle): Bianco, Basso ($10^4 - 10^3$ ufc /g), Medio (10^5 ufc /g), Alto 10^6 ufc /g (10^7 ufc /g per caeca)
- c) 2 replicati per livello; semina in doppio
- d) 5 matrici diverse (applicazione orizzontale del metodo)
- e) Ogni laboratorio deve testare 8 campioni per matrice (40 per ILS)

Risultati discussi ad Ulthrech, NL nel gennaio 2014





 *Campylobacter*
Laboratorio Nazionale di Riferimento

Campylobacter and Helicobacter related organism (CHRO)

Aberdeen(Scotland,UK)15-19 settembre 2013

La domande sono sempre le stesse: da oltre 30 anni e
16 workshop sul tema:

- Quali sono i fattori di rischio che inducono la malattia?
- Qual è l'origine?
- Come possiamo controllarla?
-

Tutte questioni ancora aperte .





 *Campylobacter*
Laboratorio Nazionale di Riferimento



a) Risk factors for *Campylobacter* spp. contamination in broiler fresh meat production in Italy

Elisabetta Di Giannatale , Gabriella Di Sera no, Giorgio Iannitto, Annafranca Sperandii, Margherita Perilli, Simona Iannetti, Paolo Calistri, Vincenza Prencipe

b) Quantification of *Campylobacter* in broilers at different stages of slaughter

Elisabetta Di Giannatale, Gabriella Di Sera no, Ilenia Platone, Annafranca Sperandii, Federico Di Fabio, Simona Iannetti, Vincenza Prencipe





 *Campylobacter*
Laboratorio Nazionale di Riferimento



PCR identification of polymorphic *C. jejuni* isolated from raw milk

Alessandra Alessiani, Francesca Marotta, Walter Vencia, Lucia Decastelli, Vincenza Prencipe
Elisabetta Di Giannatale

Determination of epidemiology of clinically isolated *Campylobacter* strains in Italy by Multilocus Sequence Typing

Francesca Marotta, Giuliano Garofolo, Walter Vencia, Lucia Decastelli, Gabriella Di Serafino,
Elisabetta Di Giannatale

- National Reference Laboratory for *Campylobacter*, Istituto Zoopro lattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise 'G. Caporale', Teramo, Italy
- Istituto Zoopro lattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino, Italy






... Fonti di infezione per l'uomo

a) Pur restando il pollo la principale fonte di infezione per l'uomo, altri serbatoi prendono sempre più forza: l'acqua superficiale o delle piscine, le insalate pronte, i prodotti lattiero caseari

b) Studi retrospettivi (A.J.Code et al.) basati sul sequenziamento dell'intero genoma, hanno dimostrato che dal 2003 in poi c'è stata una diminuzione degli isolati attribuibili al pollo (51,2-44,2%) con concomitante aumento dei ceppi attribuibili ai ruminanti (39,5-46,2%)



Altre Fonti di infezione per l'uomo

- 
- a) Stessi risultati in Inghilterra con lavori basati sulla MLST, che riportano i bovini come seconda fonte di infezione
- b) Lavori sulle acque superficiali , acque di scarico , piscine hanno confermato l'importanza di questa fonte anche ai fini dell'impatto . La caratterizzazione dei ceppi con MLST conferma la grande diversità e molti genotipi condivisi fra popolazione e corpo idrico.
- 
- 

Altre Fonti di infezione per l'uomo



2006 Nuova Zelanda 16.000 casi/ anno.

- a) Azione concertata governo e produttori: riduzione dell'infezione nei polli e susseguente riduzione del 50% dei casi umani (<10 anni)
- b) La riduzione nel pollame, ha portato ad un cambiamento nell'epidemiologia: le notifiche ora sono maggiori in area rurale rispetto a quella urbana e la più alta proporzione non è legata al pollo ma ai ruminanti





Criteri microbiologici usati come criterio decisionale per il controllo del *Campylobacter* nella carne di pollo




Risk assessment basato su criteri microbiologici

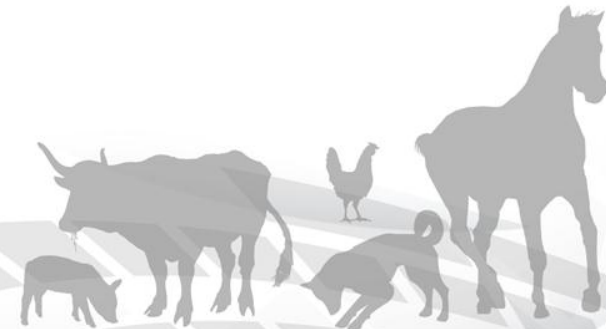


- a) in Nuova Zelanda accordo con i produttori, delle regole in parte obbligatorie e in parte volontarie.
- b) un obiettivo obbligatorio. .. data base microbiologico nazionale, per rilevare routinariamente i livelli di contaminazione al macello.
- c) L'indicatore primario della performance: cut-off di 6000 ufc/lavaggio dell'animale e in non più di 6 risultati non soddisfacenti negli ultimi 15 giorni.
- d) 3 anni di monitoraggio : stringenti > delle misure di controllo ...riduzione dei casi umani




Paesi bassi: criteri microbiologici

- 
- a) Il governo ha sostenuto i criteri del processo di igiene per *Campylobacter* in carne di pollo: determinazione dei livelli di contaminazione mensile delle carcasse dopo raffreddamento....
- b) E' stato valutato l'impatto dell'igiene di processo usando modelli matematici collegando la probabilità della malattia nell'uomo con il numero di batch non conformi a livello di produzione.



Paesi bassi: criteri microbiologici


- 
- a) ...sostanziali differenze fra contaminazione e rischio associato all'uomo per i prodotti derivanti dai differenti impianti.
- b) fissando criteri di igiene di processo, i 2/3 della malattia può essere prevenuta se nessuno delle 5 unità campionarie supera il limite di 1000 ufc/g di pelle del petto.
- c) ..vantaggio economico: costo per le industrie di 2 milioni di euro /anno.. una diminuzione della malattia stimata su 9 milioni di euro anno.

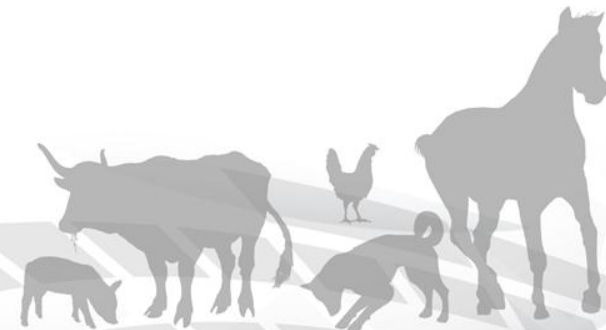


Altri paesi

Danimarca :analisi del rischio basata sui criteri microbiologici come uno strumento per il controllo della campylobacteriosi . E' stato fissato il limite massimo di campioni aventi livelli di contaminazione critici che si possono accettare. L'applicazione nel 2007-2010 ha portato ad un notevole diminuzione dei casi.



-  a) In Inghilterra, analisi del rischio sulla base di dati sulla contaminazione dei lotti di macellazione e carcasse al macello e dati di produzione
- b) I dati raccolti da 1500 aziende con un questionario sulle infrastrutture dell'azienda, tipo e modo di allevamento e il tempo di trattamento ecc.
- c) La conclusione è stata che i livelli di contaminazione sulle carcassa possono diminuire implementando le misure di controllo alla produzione e preparazione.





IZSAM G. CAPORALE
TERAMO

 *Campylobacter*
Laboratorio Nazionale di Riferimento

Campylobacter Surveillance Program in Islanda

a) Pre-macellazione-campioni fecali

Testare i gruppi di broiler 5 giorni prima della macellazione.

Se positivo: i prodotti vengono congelati o trattati al calore

a) Slaughter - caecal samples

I gruppi negativi al *Campylobacter* (pre-slaughter) sono testati al macello. Se positivo, stop alla distribuzione e congelare o trattare al calore il resto.

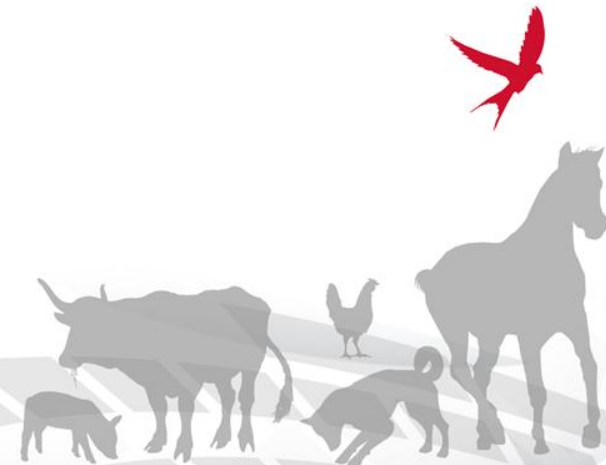


Controllo della produzione primaria




a) Progetto Camcon (prog.FP7)

«....le misure di biosicurezza sono le più importanti nel prevenire l'introduzione di campylobacter nei branchi di pollo..... buone pratiche alla macellazione




Efficacia di interventi per diminuire la contaminazione delle carcasse al macello

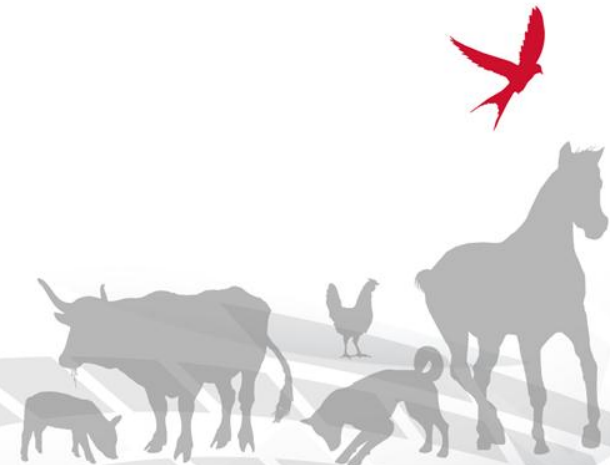
- 
- a) Trattamento delle carcasse nel tunnel pre-raffreddamento o rimozione della carcassa dalla linea pre-raffreddamento o trattamento e riammissione nella linea o trattamento dopo raffreddamento
 - b) Trattamento con cloro sotto a 18ppm, acido lattico e azoto liquido: I migliori risultati con spray di acido lattico e azoto liquidi.
 - c) Trattamento al vapore + ultrasuoni al macello: diminuzione di 1 log₁₀



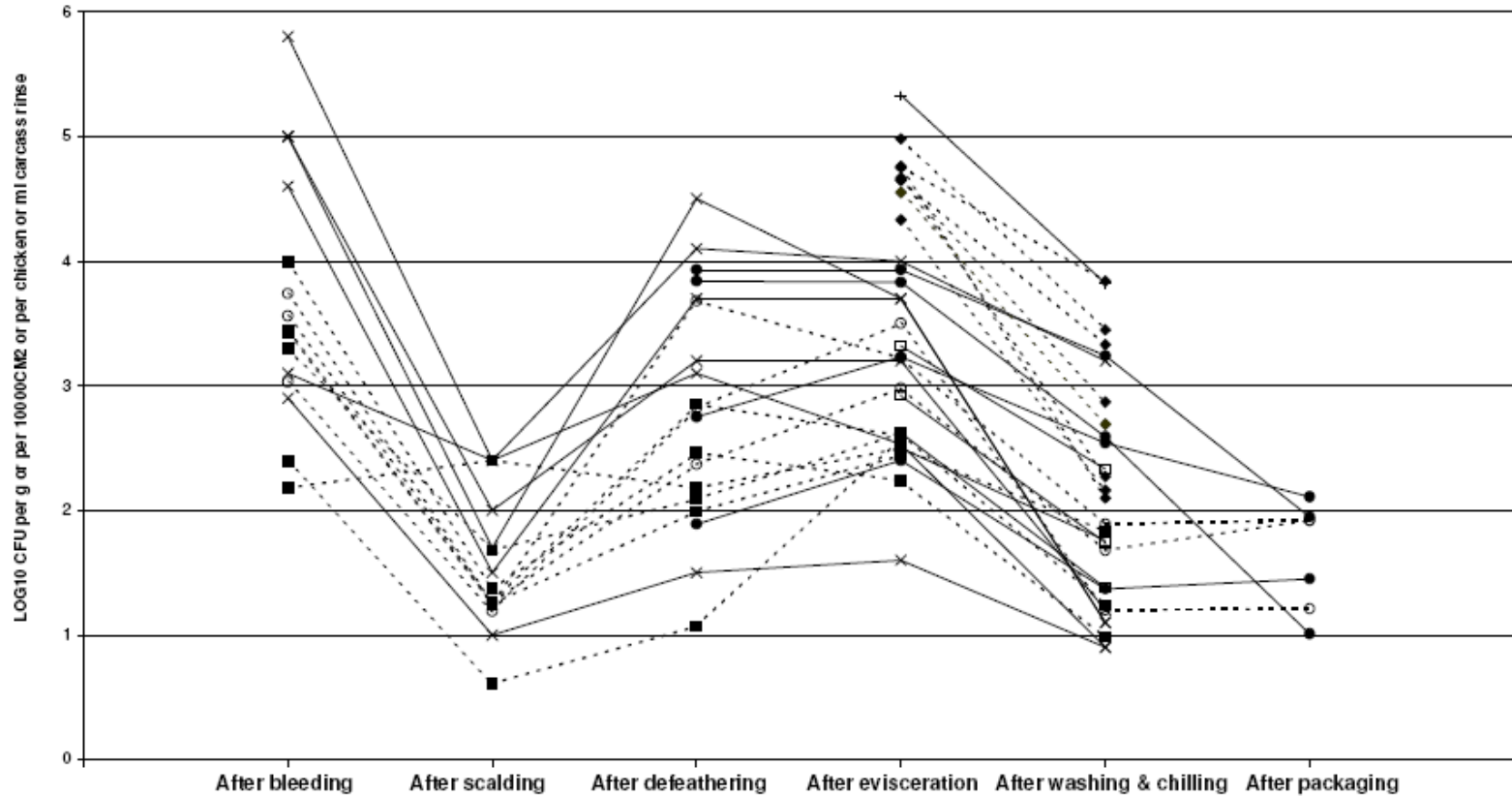
Ruolo del macello



Il ruolo del macello nelle cross contaminazione si è man mano ridotto. La macellazione di un lotto positivo comporta un aumento della contaminazione delle carcasse. Prove condotte hanno dimostrato che macellare un lotto negativo dopo un positivo determina sì una cross-contaminazione ma che si riduce rapidamente.....



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

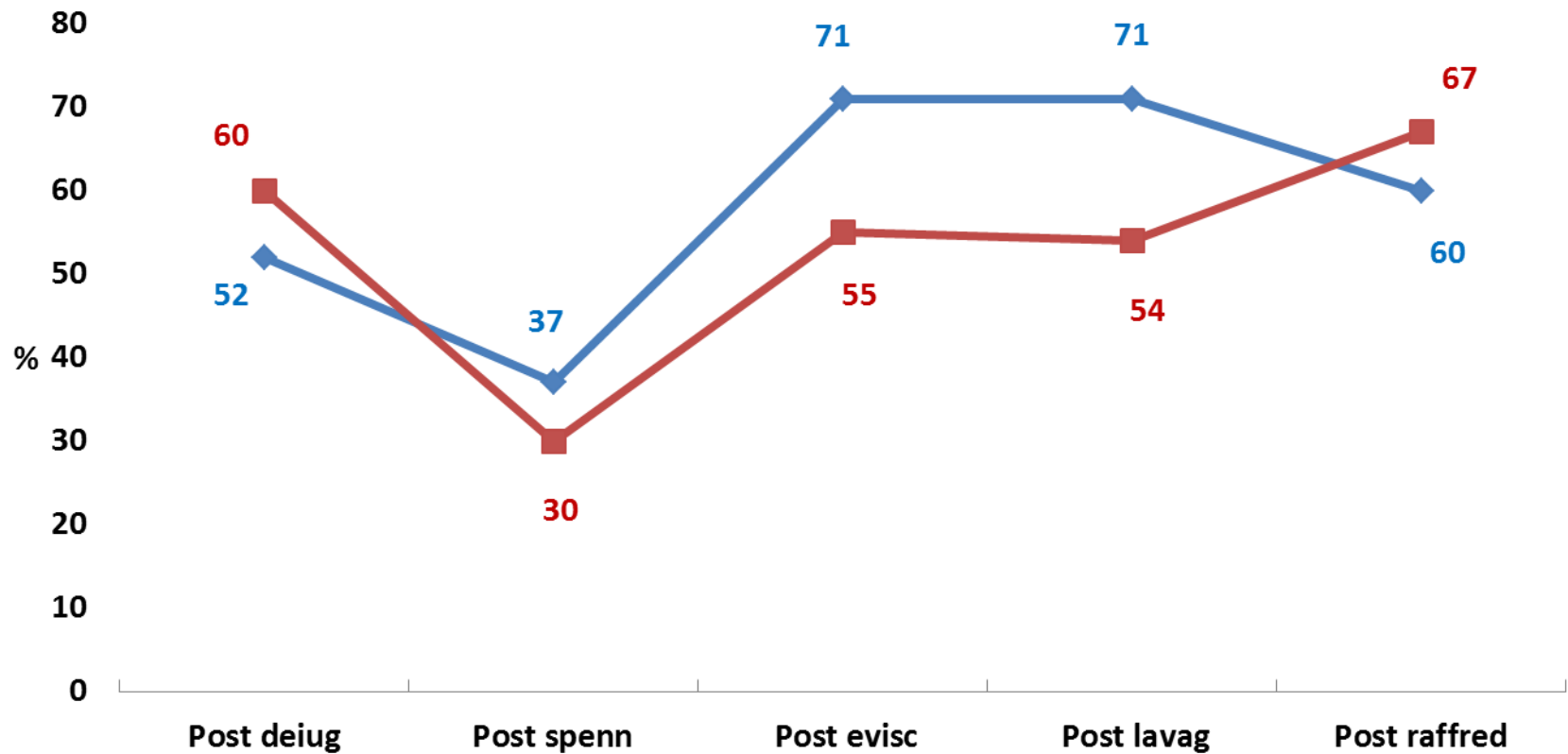


KEY: ■, Oosterom et al., 1983b; □, Wempe et al., 1983; ○, Izat et al., 1988; +, Cason et al., 1997; x, Berrang and Dickens, 2000; ◆, Stern and Robach, 2003; ●, Rosenquist et al., 2006.



Prevalenze nelle varie fasi di macellazione

◆ Meschino di Atri ■ Montorio/Morro D'Oro





 **Campylobacter**
Laboratorio Nazionale di Riferimento

Altre Strategie per ridurre la contaminazione nell'uomo: Vaccini

Vasta comunità si sta occupando di vaccini , con varie formulazioni:

- a) Vaccino basato sulle flagelline di Salmonella
- b) Ricombinante attenuato con Salmonella (induce la riduzione di 2,5-3 log in gruppi di vaccinati)
- c) vaccino veicolato da adenovirus per la prevenzione della colonizzazione (canada)
- d) vaccinazione orale con ceppo di S.typhimurum Δ aroA o di E.coli (APEC) esprimenti antigene CjaA di Cj,



Grazie per l'attenzione!

