

INDAGINE SULLA COLONIZZAZIONE DA *CAMPYLOBACTER* TERMOFILINI IN ALLEVAMENTI DI TACCHINI DA CARNE: RISULTATI PRELIMINARI

Giacomelli M., Maschio M., Piccirillo A.

Dipartimento di Biomedicina Comparata e Alimentazione, Università degli Studi di Padova, Viale dell'Università, 16 - 35020 Legnaro (Padova).

Summary

Since epidemiology of thermophilic campylobacters in turkeys has been scarcely investigated, we carried out longitudinal studies aimed at identifying potential sources and vehicles of *Campylobacter* infection in commercial meat turkey farms. A preliminary sampling in turkey breeders flocks was carried out in order to detect a *Campylobacter*-positive flock. Then, a monitoring of 2 meat turkey farms rearing the progeny of the positive turkey breeders flocks was performed. *Meconium* was collected from day-old chicks at the hatchery and then faecal swabs were collected three times at the farm (at the beginning, middle and end of the production cycle). Farm sampling consisted of multiple drinking water samples, surface swabs, air, overshoe samples in the anteroom and inside the house, and insects. Sampling was also carried out during downtime. Isolation and identification of *Campylobacter* spp. were performed by a conventional culture method and a multiplex end-point PCR assay, respectively. Day-old chicks tested negative for thermophilic campylobacters, whereas *C. jejuni* and *C. coli* were subsequently isolated from birds throughout the entire cycle in all flocks except for one. Both *Campylobacter* species were also frequently isolated from drinkers, flies and lesser mealworms. Water, air from inside the house, and surface swabs were always negative. These findings suggest that vertical transmission could not be an important source of flock infection, whereas horizontal transmission should be considered the major route for colonization of turkeys, as campylobacters were found in several environmental sources.

INTRODUZIONE

L'infezione umana da *Campylobacter* termofili (soprattutto *C. jejuni* e *C. coli*) costituisce un problema di Sanità Pubblica di notevole rilevanza, essendo ormai da anni la zoonosi più frequentemente riportata nell'Unione Europea (EFSA & ECDC, 2012) e una delle principali cause di gastroenterite batterica umana a livello mondiale (Humphrey *et al.*, 2007). Le specie avicole domestiche sono il principale *reservoir* di *Campylobacter* termofili, che albergano nel loro tratto gastroenterico senza manifestare sintomatologia. La maggior parte degli studi svolti fino ad oggi sull'infezione da *Campylobacter* spp. negli avicoli riguarda il pollo, al quale viene riconosciuto un ruolo di rilievo quale fonte d'infezione per l'uomo. Infatti, la manipolazione, la preparazione e il consumo di carne di pollo rappresentano la causa principale di campilobatteriosi umana (EFSA, 2010). Al contrario, sebbene il tacchino da carne sia considerato una potenziale fonte di trasmissione di *Campylobacter* spp. all'uomo e nonostante la sua carne sia di largo consumo, la colonizzazione da parte di *Campylobacter* spp. di questa specie avicola commerciale è stata scarsamente indagata. Da indagini svolte negli scorsi anni in Nord Italia dal

nostro gruppo di ricerca è emersa una notevole diffusione di *C. jejuni* e *C. coli* sia in allevamenti intensivi di polli, sia in allevamenti intensivi di tacchini da carne, e la persistenza di questi microrganismi durante tutto il ciclo produttivo nei gruppi di tacchini (Giacomelli *et al.*, 2012a, 2012b). Alla luce di questi riscontri, abbiamo ritenuto necessario approfondire le dinamiche epidemiologiche dell'infezione da *Campylobacter* termofili nel tacchino da carne, in particolare per individuare le possibili fonti d'introduzione e le vie di diffusione del microrganismo negli allevamenti intensivi, aspetto che non è stato ancora chiarito. A questo scopo è stato intrapreso un monitoraggio longitudinale in due allevamenti intensivi di tacchini da carne che ospitavano la progenie di riproduttori colonizzati da *Campylobacter* termofili. Il monitoraggio si è svolto per due cicli produttivi consecutivi, durante i quali sono stati presi in esame sia gli animali, sia campioni ambientali e possibili vettori di *Campylobacter* spp.

MATERIALI E METODI

Campionamento

Nella prima fase dell'indagine sono stati svolti campionamenti (60 tamponi cloacali) in gruppi di tacchini riproduttori al fine di identificare un gruppo colonizzato da *Campylobacter* spp. Successivamente, sono stati eseguiti campionamenti in due allevamenti intensivi di tacchini da carne (A e B) che hanno accasato la progenie dei riproduttori positivi. I gruppi di pulcini sono stati esaminati prima dell'accasamento, prelevando il meconio da 36 soggetti in incubatoio. Nei due allevamenti sono stati prelevati i seguenti campioni: feci ciecali (36), acqua da 3 punti della linea (inizio e fine impianto, abbeveratoi), campioni ambientali (calzari nell'anticamera e nel capannone, polvere e aria), insetti (mosche, scarafaggi e tenebrioni). Quando presenti, sono stati prelevati anche topi. I campioni sono stati raccolti durante il vuoto sanitario e durante il ciclo (inizio, metà e fine). Gli stessi campionamenti sono stati svolti anche nel ciclo successivo.

Subito dopo la raccolta, i tamponi (fecali e da abbeveratoi) sono stati posti in terreno di trasporto Amies con carbone (Copan, Brescia, Italia) e, assieme agli altri campioni, sono stati mantenuti a temperatura di refrigerazione fino all'arrivo al laboratorio e processati entro 1-2 ore dal prelievo. L'aria è stata aspirata tramite lo strumento SAS Super 100TM (International PBI S.r.l., Milano, Italia) direttamente su piastre di Karmali agar (OXOID, Basingstoke, UK), che sono state immediatamente inserite in apposite buste con generatori di microaerofilia CampyGen® (OXOID).

Isolamento e identificazione

Le piastre di Karmali agar utilizzate per il campionamento dell'aria sono state poste in incubazione a 41,5°C per 48 ore, per poi essere esaminate alla ricerca delle colonie tipiche di *Campylobacter* spp. I campioni di meconio, i tamponi e i campioni ambientali sono stati inizialmente inoculati nel brodo di arricchimento selettivo Exeter rispettando un rapporto 1:10 (campione:brodo) e incubati a 41,5°C in condizioni di microaerofilia. Gli insetti sono stati riuniti in *pool* (suddivisi per specie), triturati con un pestello e quindi inoculati nel brodo Exeter come sopra descritto. Per i campioni di acqua, la fase di arricchimento selettivo è stata preceduta dalla filtrazione dell'acqua attraverso membrane sterili con pori del diametro di 0,20 µm (Sartorius, Goettingen, Germania) tramite un sistema di pompa a vuoto. Dopo 48 ore di incubazione,

un'aliquota (150 µl) di ciascuna brodocoltura è stata seminata su Karmali agar, previa filtrazione secondo la procedura descritta da Steele & McDermott (1984). Le piastre sono state incubate per 48 ore a 41,5°C in microaerofilia e quindi esaminate per la ricerca delle colonie tipiche di *Campylobacter* spp. Da ciascuna piastra sono state prelevate almeno tre colonie sospette, da sottoporre ad identificazione di genere e di specie. Questa è stata ottenuta mediante *end-point multiplex* PCR, secondo il protocollo descritto da Yamazaki-Matsune *et al.* (2007), al quale sono state apportate lievi modifiche. Il DNA è stato estratto mediante bollitura per 20 minuti di un'ansata di patina batterica stemperata in 500 µl di acqua distillata sterile.

RISULTATI

Campylobacter spp. è stato isolato da tutti i riproduttori esaminati e l'identificazione di specie ha rivelato la presenza di *C. jejuni* e *C. coli*, con la predominanza della prima specie (67,7% degli isolati). Al contrario, il microrganismo non è stato isolato da nessuno dei campioni di meconio in nessuno degli allevamenti. *C. jejuni* e *C. coli* sono stati anche isolati dalle feci di tutti i gruppi di animali monitorati sia nel primo ciclo produttivo, sia nel secondo, in entrambi gli allevamenti presi in esame. A differenza di quanto riscontrato nei riproduttori, in tutti i gruppi di tacchini dell'allevamento B e in entrambi i cicli produttivi *C. coli* era la specie predominante (dal 50% al 100% dei ceppi isolati, a seconda del campionamento). La predominanza di *C. coli* su *C. jejuni* è stata riscontrata anche nell'allevamento B, in particolare nei gruppi monitorati durante il primo ciclo produttivo (dall'80% al 100% dei ceppi isolati, a seconda del campionamento), mentre nel gruppo esaminato durante il secondo ciclo *C. coli* era l'unica specie presente.

Nell'allevamento A il microrganismo è stato isolato dagli animali a partire dal campionamento di inizio ciclo e la sua presenza è stata confermata nei campionamenti successivi (metà e fine ciclo) in tutti i gruppi e in entrambi i cicli produttivi monitorati. Anche nell'allevamento B *Campylobacter* spp. colonizzava gli animali fin dall'inizio di entrambi i cicli produttivi, tuttavia, la sua presenza è stata riscontrata sino a fine ciclo solo durante il secondo ciclo produttivo e solo in un gruppo dei due presenti in allevamento nel primo ciclo.

Per quanto riguarda la ricerca di *Campylobacter* spp. in insetti, acqua e campioni ambientali, *C. jejuni* e *C. coli* sono stati isolati molto frequentemente durante i cicli produttivi da mosche e tenebrioni, insetti che erano presenti e quindi sono stati prelevati nella gran parte dei campionamenti, mentre gli scarafaggi sono stati catturati solo in un'occasione, nella quale sono risultati negativi per *Campylobacter* spp. Anche dall'acqua presente negli abbeveratoi durante il ciclo produttivo sono stati isolati frequentemente *C. jejuni* e *C. coli*. Al contrario, l'acqua di abbeverata prelevata all'inizio dell'impianto è sempre risultata negativa, mentre quella prelevata alla fine è risultata positiva solo in un caso. Similmente, solo in un caso *C. jejuni* è stato isolato dai calzari indossati nell'anticamera. Inoltre *C. jejuni* è stato isolato anche da un topo catturato nell'allevamento A a metà del secondo ciclo produttivo.

Esito sempre negativo è stato ottenuto invece dal campionamento dell'aria e dai campioni di polvere. L'isolamento di *C. jejuni* e *C. coli* dalle fonti sopra menzionate è avvenuto solo durante i cicli produttivi, mentre durante il vuoto sanitario il microrganismo non è mai stato isolato da nessuno dei campioni raccolti.

DISCUSSIONE

Il mancato isolamento di *Campylobacter* termofili dal meconio della progenie dei riproduttori positivi suggerisce che l'infezione non venga trasmessa per via verticale nelle specie avicole, in accordo con quanto affermato da altri Autori (Jacobs-Reitsma *et al.*, 1995; Smith *et al.*, 2004; Callicott *et al.*, 2006). Più in generale, il riscontro di negatività in tutti i gruppi di pulcini accasati in entrambi i cicli produttivi suggerisce che il microrganismo non faccia il suo ingresso in allevamento attraverso i tacchini e conferma quanto da noi rilevato in un'indagine precedente (Giacomelli *et al.*, 2012b) e quanto riportato in altri studi sul tacchino (Hafez *et al.*, 2001; Smith *et al.*, 2004; Wesley & Muraoka, 2011). Di conseguenza, appare verosimile che gli animali siano stati colonizzati da *Campylobacter* spp. successivamente al loro ingresso in allevamento, per via orizzontale. Tra le potenziali fonti e/o veicoli di trasmissione considerate nella presente indagine, l'acqua degli abbeveratoi è risultata spesso positiva durante i cicli produttivi, in concomitanza con la positività degli animali, mentre l'acqua prelevata dalla linea di abbeverata è risultata positiva solo in un caso. Sulla base di questi riscontri, l'acqua di abbeverata non sembra essere una fonte di ingresso di *Campylobacter* spp. nei gruppi di tacchini ed è quindi probabile che la contaminazione dell'acqua degli abbeveratoi sia avvenuta successivamente alla colonizzazione degli animali da parte del microrganismo. L'acqua, quindi, per quanto non sembri costituire un rischio, se non molto limitato, per l'introduzione di *Campylobacter* spp. in allevamento, può rappresentare un veicolo di diffusione di *Campylobacter* spp. nei gruppi di tacchini. Per quanto riguarda gli insetti, il loro ruolo quali possibili vettori di *Campylobacter* spp. è stato proposto e successivamente messo in luce da alcuni Autori (Jacobs-Reitsma *et al.*, 1995; Gregory *et al.*, 1997; Hald *et al.*, 2004), tuttavia le opinioni e i riscontri a riguardo rimangono contrastanti (EFSA, 2011). In particolare, le mosche sarebbero implicate nella trasmissione di *Campylobacter* spp. in quanto vettori meccanici di materiale fecale, e di conseguenza dei microrganismi in esso presenti, mentre scarafaggi e tenebrioni, permanendo a lungo nell'ambiente di allevamento, soprattutto nelle pareti dei capannoni, potrebbero rivestire un ruolo nella trasmissione di *Campylobacter* spp. tra cicli produttivi successivi (EFSA, 2011). Nel presente studio mosche e tenebrioni sono risultati spesso positivi per *C. jejuni* e/o *C. coli* in presenza di colonizzazione degli animali, ma mai durante il vuoto sanitario. Non potendo determinare se sia avvenuta prima la contaminazione degli insetti o la colonizzazione degli animali, si può comunque affermare che mosche e tenebrioni possono fungere da veicolo di trasmissione e quindi di diffusione di *Campylobacter* all'interno del capannone, e, nel caso delle mosche, anche all'esterno. Al contrario, la loro costante negatività durante il vuoto sanitario tende ad escludere la possibilità che questi insetti possano concorrere alla trasmissione di *Campylobacter* spp. tra cicli produttivi successivi. Infine, la negatività di tutti i campioni prelevati durante il vuoto sanitario fa pensare che *Campylobacter* spp. non persista all'interno del capannone tra cicli produttivi, ma venga reintrodotta di ciclo in ciclo. Questo aspetto andrebbe ulteriormente indagato attraverso studi mirati. Per quanto riguarda invece la persistenza di *Campylobacter* spp. nei tacchini durante uno stesso ciclo produttivo, merita attenzione il fatto che un gruppo sia risultato negativo al campionamento svolto poco prima del carico per la macellazione, e che in un altro gruppo sia stata osservata una riduzione del numero di campioni fecali positivi in occasione dell'ultimo campionamento

rispetto ai precedenti. Per quanto numericamente limitate, queste osservazioni sono degne di nota. Infatti, benché si ritenga che, così come nel broiler, l'infezione da *Campylobacter* spp. nel tacchino non sia autolimitante (Hafez *et al.*, 2001; Smith *et al.*, 2004; Wesley & Muraoka, 2011), nonostante il ciclo produttivo di quest'ultima specie sia notevolmente più lungo, è stata segnalata una riduzione della frequenza di isolamento di *Campylobacter* spp. con il progredire del ciclo produttivo in gruppi di tacchini da carne (Kiess *et al.*, 2007; Thorsness *et al.*, 2008).

CONCLUSIONI

I risultati preliminari dell'indagine da noi svolta allo scopo di approfondire le dinamiche epidemiologiche dell'infezione da *Campylobacter* termofili nell'allevamento del tacchino da carne hanno innanzitutto confermato la diffusa e persistente presenza di *C. jejuni* e *C. coli* in questa specie animale destinata al consumo umano. Inoltre, sembrano avvalorare l'ipotesi circa il limitato ruolo della trasmissione verticale nell'introduzione di *Campylobacter* spp. nei gruppi di tacchini, ed individuato dei possibili veicoli e/o fonti di trasmissione di questi microrganismi nell'ambiente di allevamento. Sulla base dei riscontri finora ottenuti, l'indagine proseguirà con la caratterizzazione genetica dei ceppi isolati dalle diverse matrici analizzate, in modo tale da approfondire le eventuali relazioni tra i ceppi di diversa origine ed accertare quali possano essere le fonti o i veicoli d'infezione più accreditati. Questo aspetto è particolarmente importante, perché solo conoscendo quali sono le fonti d'infezione e i veicoli di trasmissione di *Campylobacter* spp. in allevamento è possibile elaborare delle strategie di prevenzione e controllo in grado di limitare la contaminazione dei gruppi di animali e il ciclo infettivo del microrganismo.

BIBLIOGRAFIA

1. Callicott KA, Friethriksdóttir V, Reiersen J, Lowman R, Bisailon JR, Gunnarsson E, Berndtson E, Hiett KL, Needleman DS and NJ Stern. (2006). Lack of evidence for vertical transmission of *Campylobacter* spp. in chickens. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 5794-5798.
2. European Food Safety Authority. (2010). Scientific opinion on quantification of the risk posed by broiler meat to human campylobacteriosis in the EU. *EFSA Journal*, 8: 1437.
3. European Food Safety Authority. (2011). Scientific Opinion on *Campylobacter* in broiler meat production: control options and performance objectives and/or targets at different stages of the food chain. *The EFSA Journal* 9: 2105.
4. European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control. (2012). The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2010. *EFSA Journal* 10: 2597.
5. Giacomelli M, Andrighetto C, Rossi F, Lombardi A, Rizzotti L, Martini M and A Piccirillo. (2012a). Molecular characterization and genotypic antimicrobial resistance analysis of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from broiler flocks in northern Italy. *Avian Pathol.* 41: 579-588.

6. Giacomelli M, Andrighetto C, Lombardi A, Martini M and A Piccirillo. (2012b). A longitudinal study on thermophilic *Campylobacter* spp. in commercial turkey flocks in northern Italy: occurrence and genetic diversity. *Avian Dis.* 56: 693-700.
7. Gregory E, Barnhart H, Dreesen DW, Stern NJ and JL Corn. (1997). Epidemiological study of *Campylobacter* spp. in broilers: source, time of colonization, and prevalence. *Avian Dis.* 41: 890-898.
8. Hafez HM, Schroth S, Stadler A and D Schulze. (2001). Detection of *Salmonella*, *Campylobacter* and verotoxin producing *E. coli* in turkey flocks during rearing and processing. *Arch. Geflueglk.* 65: 130-135.
9. Hald B, Skovgard H, Bang DD, Pedersen K, Dybdahl J, Jespersen JB and M Madsen. (2004). Flies and *Campylobacter* infection of broiler flocks. *Emerg. Infect. Dis.* 10: 1490-1492.
10. Humphrey T, O'Brien S and M Madsen. (2007). Campylobacters as zoonotic pathogens: a food production perspective. *Int. J. Food Microbiol.*, 117: 237-257.
11. Jacobs-Reitsma WF, van de Giessen AW, Bolder NM and RW Mulder. (1995). Epidemiology of *Campylobacter* spp. at two Dutch broiler farms. *Epidemiol. Infect.* 114: 413-421.
12. Kiess AS, Kenney PB and RR Nayak. (2007). *Campylobacter* detection in commercial turkeys. *Br. Poult. Sci.*, 48: 567-572.
13. Smith K, Reimers N, Barnes HJ, Lee BC, Siletzky R and S Kathariou. (2004). *Campylobacter* colonization of sibling turkey flocks reared under different management conditions. *J. Food Prot.* 67: 1463-1468.
14. Steele TW and SN McDermott. (1984). The use of membrane filters applied directly to the surface of agar plates for the isolation of *Campylobacter jejuni* from feces. *Pathology* 16: 263-265.
15. Thorsness JL, Sherwood JS, Danzeisen GT, Doetkott C and CM Logue. (2008). Baseline *Campylobacter* prevalence at a new turkey production facility in North Dakota. *J. Food Prot.* 71: 2295-2300.
16. Wesley IV and WT Muraoka. (2011). Time of entry of *Salmonella* and *Campylobacter* into the turkey brooder house. *Food Bioprocess. Technol.* 4: 616-623.
17. Yamazaki-Matsune W, Taguchi M, Seto K, Kawahara R, Kawatsu K, Kumeda Y, Kitazato M, Nukina M, Misawa N and T Tsukamoto. (2007). Development of a multiplex PCR assay for identification of *Campylobacter coli*, *Campylobacter fetus*, *Campylobacter hyointestinalis* subsp. *hyointestinalis*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter lari* and *Campylobacter upsaliensis*. *J. Med. Microbiol.* 56: 1467-1473.