

COMUNICAZIONE 10

RICERCHE SULLA SOPRAVVIVENZA DI *C. JEJUNI* SUL GUSCIO DI UOVA DA CONSUMO. REPLICAZIONE DEL GERME NEL CONTENUTO DI UOVA INFETTATE SPERIMENTALMENTE**G. Di Modugno, A. Camarda, V. Ficarella, E. Circella, D. Pennelli, D. Di Modugno**

Dipartimento di Sanità e Benessere degli Animali, Sezione di patologia Aviaria, Università degli Studi di Bari

Parole chiave: *Campylobacter jejuni*, uova, tossinfezioni alimentari.**Survival of *Campylobacter jejuni* on the eggshell. Growth in albumen and yolk of table eggs experimentally contaminated**Key words: *Campylobacter jejuni*, eggs, food poisoning

Summary: The presence of *Campylobacter jejuni* on the eggshell experimentally contaminated and kept at 20-25°C and 4°C, and the ability of the microorganism to penetrate, survive and grow in the albumen and yolk, was verified. *Campylobacter jejuni* was recovered nearly from 100% of the eggshells after 30' from infection. The shells contamination decreased faster in the samples kept at environmental temperature than at 4°C. *Campylobacter jejuni* was rarely recovered after 36 hours both from eggshells refrigerated and placed at 20-25°C. The detection of *Campylobacter jejuni* in the albumen and yolk was sporadic. The *Campylobacter jejuni* counts decreased by about 5 log₁₀ CFU/ml in the white experimentally contaminated (10¹⁰ FCU/ml) and refrigerated or kept at environmental temperature within 48 hours. *Campylobacter jejuni* was recovered in the albumen until 9 days after the experimental contamination. In the yolk (10¹⁰ CFU/ml) the number of inoculated *Campylobacter* decreased more slowly. At 4°C the bacteria survived for 25 days, while at 20-25°C was still detected after 22 days.

Correspondence: prof. G. Di Modugno, Dip. di Sanità e Benessere degli Animali, Sez. Patologia Aviaria Fac. Medicina Veterinaria - S.P. per Casamassima Km 3, 70010 Valenzano (Bari - Italia) e-mail: g.dimodugno@veterinaria-j.uniba.it

Introduzione

Le tossinfezioni alimentari da *Campylobacter jejuni* vengono segnalate con frequenza sempre maggiore (1). Principale serbatoio del germe è considerato il pollame, dal quale il *Campylobacter (C.) jejuni* è isolato dall'apparato gastroenterico e dalle carcasse (1, 3). Precedenti nostre ricerche (2) effettuate in allevamenti commerciali hanno evidenziato che *Campylobacter jejuni* può riscontrarsi con notevole frequenza anche nell'apparato riproduttore di galline ovaiole in deposizione, nonché sul guscio delle uova deposte (in percentuale variabile dal 2,5% al 22,2% in relazione al grado di imbrattamento del guscio). Resta ancora poco chiaro il ruolo svolto dalle uova nella epidemiologia della trasmissione dell'infezione all'uomo. Si è inteso, pertanto, verificare la sopravvivenza del *Campylobacter jejuni* sul guscio di uova infettate sperimentalmente nonché la sua capacità di penetrazione attraverso i pori e di contaminazione del contenuto dell'uovo. È stata altresì valutata la capacità di replicazione del germe in albume e tuorlo infettati sperimentalmente e tenuti in diverse condizioni di temperatura.

Materiali e metodi

Infezione sperimentale delle uova. N.330 uova, a circa 3 ore dalla deposizione, sono state infettate sperimentalmente con una sospensione contenente *Campylobacter jejuni* alla concentrazione di 1x10⁶ UFC/ml. Le uova sono state inizialmente distinte in due gruppi e contaminate, quelle del primo gruppo mediante immersione per 1 minuto e quelle del secondo mediante immersione per 15 minuti nella predetta sospensione. Successivamente sono state suddivise in ulteriori 2 aliquote, la prima tenuta a temperatura ambiente (20-25°C) e la seconda a 4°C. Sono stati effettuati tentativi di reisolare il germe dal guscio e dal contenuto (albume e tuorlo separatamente) a 0,5,3,6,12,24 e 36 ore dall'infezione. Per ciascuna prova sono state effettuate n.5 ripetizioni di 5 uova ciascuna, eccetto che per il tentativo di reisolamento a 36 ore effettuato per sole 2 ripetizioni

se l'immersione delle uova nella sospensione batterica durava 1 minuto; una sola ripetizione è stata effettuata, agli intervalli di tempo indicati, se l'immersione si prolungava per 15 minuti.

Infezione sperimentale di albume e tuorlo. Sono state utilizzate per la sperimentazione uova a circa 3 ore dalla deposizione. In laboratorio, il guscio è stato lavato e disinfettato con etanolo, quindi è stato rotto, ed il contenuto è stato separato e versato asetticamente in contenitori sterili. Sono stati allestiti due pool di 80 ml rispettivamente di albume e di tuorlo, infettati con una sospensione di *Campylobacter jejuni* e suddivisi in due ulteriori aliquote di 40 ml ciascuna, rispettivamente stoccate a 4°C e a temperatura ambiente (20-25°C). I 4 campioni ottenuti evidenziavano alla conta batterica una carica di 10¹⁰ UFC/ml del germe. Da ciascun campione, ogni 24 ore, è stato isolato il *Campylobacter jejuni* e valutato il titolo con il metodo del Minimo Numero Probabile (MPN) (6). Le metodiche di isolamento, coltivazione ed identificazione del *Campylobacter* utilizzate sono state precedentemente descritte (2).

Risultati

C. jejuni è stato isolato dopo 30 minuti dal guscio di quasi tutte le uova tenute rispettivamente a temperatura ambiente ed a 4°C. Già a 12 ore dall'infezione, la probabilità di reisolare il germe dal guscio delle uova tenute a temperatura ambiente diminuiva drasticamente; lo stesso non accadeva per le uova tenute a 4°C. Infatti, il germe veniva evidenziato solo in 3 ripetizioni a 20-25°C, mentre a 4°C era reisolabile in tutte e 5 le ripetizioni da un numero elevato di uova (mediamente 4 uova per ripetizione). A 36 ore dall'infezione il microorganismo si poteva ancora evidenziare occasionalmente sia dai gusci delle uova conservate a temperatura ambiente che da quelli posti a temperatura di refrigerazione (n.2 gusci di una sola ripetizione a temperatura ambiente e n.1 guscio di due ripetizioni a 4°C). La ricerca del microorganismo sia dall'albume che dal tuorlo, se l'immersione nella soluzione inquinante perdurava per

un minuto, consentiva il reisolamento sporadico del germe indipendentemente dalla temperatura di conservazione. A temperatura ambiente il *C. jejuni* veniva reisolato da un singolo uovo e per una sola ripetizione sia dall'albume che dal tuorlo a 30' dall'inquinamento, da un solo tuorlo dopo 6 ore e da un singolo albume dopo 24 ore. A 4°C il *C. jejuni* veniva evidenziato da un singolo albume per una sola ripetizione a 30' dall'inquinamento, da un albume e da un tuorlo dopo 6 ore, e da un solo albume dopo 24 ore. In nessun caso il germe era reisolato dopo 36 ore dall'infezione delle uova. Se il tempo di immersione nella sospensione batterica veniva prolungato a 15 minuti il *C. jejuni* poteva essere isolato con frequenza maggiore sia dall'albume che dal tuorlo, specie se tenuto a temperatura di refrigerazione; questa consentiva il reisolamento da ben 3 tuorli su 5 dopo 3 e 12 ore di conservazione. Nell'albume e nel tuorlo inquinati sperimentalmente si osservava, dopo 48 ore, un calo significativo e profondo della carica batterica, che interessava in particolare l'albume (conservato sia a temperatura ambiente che 4°C) ma anche il tuorlo tenuto a temperatura ambiente (Figura 1). Nell'albume, dove il germe sopravviveva per un massimo di 9 giorni indipendentemente dalla temperatura di conservazione, la riduzione della carica infettante raggiungeva 5 log₁₀ UFC/ml. Nel tuorlo refrigerato, invece, la quantità di germi presenti si manteneva costante nelle prime 48 ore, e diminuiva progressivamente nei giorni successivi. Il Minimo Numero Probabile (MPN/ml) riscontrato variava infatti da 10¹⁰ a 10^{9,3} UFC/ml dopo 48 ore. Dopo 6 giorni diminuiva di soli 2,14 log₁₀ UFC/ml per poi calare progressivamente a meno di un log₁₀ UFC/ml (0,84 log₁₀ UFC/ml) al 25° giorno. Se il tuorlo veniva conservato a temperatura ambiente la carica batterica diminuiva in modo più incisivo già entro le 48 ore e si riduceva progressivamente nei giorni successivi, sopravvivendo fino alla 22^a giornata dall'infezione. Infatti, alla 48^a ora il MNP/ml calava di ben 3,96 log₁₀ UFC/ml, e si riduceva di 1,38 log₁₀ UFC/ml dopo 7 giorni.

Discussione

I risultati ottenuti evidenziano che la capacità di sopravvivenza del *Campylobacter jejuni* sulla superficie del guscio, è limitata a poche ore dall'infezione. La resistenza del germe, tuttavia, sembra essere influenzata dalla refrigerazione delle uova che influisce positivamente sulla vitalità del germe (6). Scarsa sembra invece la capacità di penetrazione del guscio e la successiva contaminazione del contenuto dell'uovo. Nelle nostre ricerche è stato infatti osservato che il germe attraversa occasionalmente il guscio e che l'inquinamento del contenuto dell'uovo è influenzato dalla carica infettante oltre che dal tempo di immersione nella sospensione batterica. Il *C. jejuni*, tuttavia, nelle nostre condizioni sperimentali, non è in grado di replicare, né nel tuorlo né nell'albume. Il potere inibente dell'albume, infatti, riduce in maniera significativa (di ben 5 log₁₀ nel volgere di 48 ore) il titolo (UFC/ml) del germe, che è ancora riscontrabile dopo 9 giorni dalla contaminazione sperimentale. Ricerche di altri AA, (5, 6) hanno evidenziato lo stesso calo ma anche la scomparsa del germe dall'albume entro 24-48 ore dall'infezione, utilizzando una carica

infettante pari a 3-6 log₁₀ UFC/ml. È verosimile che questa apparente discordanza nei risultati da noi ottenuti sia imputabile alla elevata carica infettante utilizzata durante le nostre ricerche (10¹⁰ UFC/ml). Ben maggiore appare invece la capacità di sopravvivenza del germe all'interno del tuorlo, dove il *Campylobacter jejuni* era ancora reisolabile dopo 25 giorni dall'infezione. Si sottolinea come evidenziato da Hanninen *et al.* (5), che la capacità di resistenza del germe all'interno del tuorlo potrebbe essere legata anche ad intrinseche caratteristiche del ceppo batterico utilizzato.

In conclusione, dalle nostre ricerche si evince che il germe può sopravvivere sul guscio, ma lo attraversa con difficoltà e solo occasionalmente ne infetta il contenuto anche se la carica inquinante è molto elevata. Non si può escludere, tuttavia, che le uova possano fungere da cross-contaminanti per frigoriferi ed alimenti in essi conservati e divenire un fomite, sia pure secondario, di tossinfezioni alimentari per l'uomo (4).

Bibliografia

1. Corry J.E.L., Atabay H.I. (2001) "Poultry as source of *Campylobacter jejuni* and related organisms" J. Appl. Microb. 90, 96-114
2. Di Modugno G., Nasti R., Camarda A., Circella E. (2000) "Tipizzazione ed antibiotico resistenza di *Campylobacter jejuni* isolati da contenuto intestinale, ovidutto e guscio di uova da consumo" Sel. Vet. 8-9, 741-750
3. Di Modugno G., Camarda A., Circella E., Ficarella V. (2000) "Aspetti epidemiologici delle infezioni da *Campylobacter jejuni* negli allevamenti di pollame" Sel. Vet. 11, 946-960.
4. Finch M.J., Blake P.A. (1985) "Foodborne outbreaks of campylobacteriosis: the United States experience, 1980-1982." Am. J. Epidemiol. 122, 262-268
5. Hanninen M.L., Korkeala H., Pakkala P. (1984) "Growth and survival characteristics of *Campylobacter jejuni* in liquid egg". J. Hyg. Camb., 92, 53-58
6. Maruyama S., Morita Y., Katsube Y. (1995) "Invasion and viability of *Campylobacter jejuni* in experimentally contaminated Japanese quails' eggs" J. Vet. Med. Sci. 57 (3), 587-590

Figura 1: Sopravvivenza di *C. jejuni* in albume e tuorlo infettati sperimentalmente e tenuti a temperatura ambiente (20-25°C) ed a 4°C

Figure 1: Survival of *C. jejuni* in albumen and yolk experimentally contaminated and kept at 20-25°C and 4°C

