

OSSERVAZIONI SULLA PRESENZA DI CAMPYLOBACTER TERMOFILII NELLE STRUTTURE DI ALLEVAMENTO E NEI BROILERS

Grilli G.¹, Calligarich C.¹, Ferrazzi V.¹, Trapani A.², Tirloni E.³, Stella S.³

¹ Università degli Studi di Milano, Dip. di Medicina Veterinaria, via Celoria 10, 20133 Milano

² Veterinario Aziendale.

³ Università degli Studi di Milano, Dipartimento di Scienze Veterinarie per la Salute, la Produzione Animale e la Sicurezza Alimentare.



Summary

Remarks on the presence of thermophilic *Campylobacter* in breeding facilities and broilers.

In this paper, we sought to obtain information on the colonisation of *Campylobacter* in some broiler groups used for breeding purposes and the presence of these bacteria in equipment used and the surrounding environment in order to acquire a better understanding of possible measures to be taken to avoid contamination. The trial was carried out over a period of 2 fattening cycles (spring-summer) in a breeding facility equipped with 3 sheds with identical equipment, dimensions, and subjects (hybrid ROSS 308 from the same incubator containing approximately 14,900♀, 10,000♂ and 10,000♂, respectively). Sampling was carried out weekly by the same operator using swabs, both within the facilities themselves (walls, drinking troughs, and feeding troughs), and on the animals. This was conducted from when the subjects were placed in brooder pens until slaughtering. In the first breeding cycle, the presence of *campylobacter* was observed in the animals at 14 days old while the facilities were contaminated at 3 weeks. In the second breeding cycle, colonisation took place a week later in both the animals and their surrounding environment. All instances of isolation made it possible to identify *Campylobacter coli*. The possible sources of contamination and the procedures to be adopted to ensure prevention will be discussed.

INTRODUZIONE

I *Campylobacter* termofili costituiscono un grave rischio per la salute umana in quanto principale causa di tossinfezione nelle popolazioni degli Stati Membri dell'Unione Europea (circa 230.000 casi nel 2015). La carne avicola è considerata la principale fonte di contaminazione per l'elevata prevalenza che questi batteri hanno negli allevamenti avicoli, soprattutto broilers. Già nel 2008, l'Unione Europea aveva condotto un'indagine con lo scopo di verificare la prevalenza di *Campylobacter* in carcasse di pollo. A questa ricerca hanno aderito ben ventisei Stati Membri dell'Unione Europea, oltre a Norvegia e Svizzera. Il batterio, in ogni paese partecipante, era stato isolato dalle carcasse di pollo da carne con una prevalenza media pari al 75,8%. Diversi studi sono stati intrapresi per diminuire la contaminazione delle carcasse al macello anche in funzione di una imminente direttiva europea che fisserà dei limiti di contaminazione nelle carcasse degli animali macellati. Varie ricerche condotte e le numerose opinioni di esperti degli ultimi 25 anni, indicano infatti che il controllo del *Campylobacter* nella catena

di produzione della carne di pollo, partendo dall'allevamento, dovrebbe ridurre la Campylobacteriosi umana (Tustin *et al.*, 2011). Lo scopo del nostro lavoro è stato quello di indagare l'andamento della contaminazione degli animali e delle strutture di allevamento al fine di identificare le possibili fonti di origine del batterio e le eventuali misure di prevenzione da adottare per evitare l'infezione da Campylobacter termofili nei broilers.

MATERIALI E METODI

Allevamento e animali

L'allevamento oggetto del controllo è sito in Piemonte ed è composto di 4 capannoni per broilers e un allevamento di bufale da latte con annesso caseificio. Per questo lavoro sono stati controllati i capannoni 1, 2 e 3 che sono coetanei ed identici dal punto di vista delle attrezzature e delle dimensioni (10 x 100 m); il capannone 4 era vuoto. Ogni capannone, dotato di ventilazione naturale, possedeva 2 linee di mangiatorie antispreco e 2 linee di abbeveratoi a nipple. Il capannone 1 aveva accasato circa 14.900 broilers femmine mentre il 2 ed il 3 contenevano circa 10.000 broilers maschi, tutti gli animali appartenevano allo stesso ibrido ROSS 308 e provenivano dallo stesso incubatoio. In occasione dei sopralluoghi settimanali, venivano sottoposti a necropsia gli animali ritrovati deceduti nella giornata in collaborazione con il veterinario aziendale.

Campionamento e analisi

Nel corso di questo studio sono stati seguiti 2 cicli di allevamento (maggio/luglio, agosto/settembre) e il campionamento è avvenuto, a partire dall'accasamento, con cadenza settimanale ed è stato effettuato sempre dallo stesso operatore fino alla macellazione dei soggetti. Il campionamento prevedeva l'uso di tamponi Transystem Film-Amiens (Oxoid-ThermoFisher) con terreno di trasporto di Amiens senza carbone. Questi tamponi venivano inumiditi e strisciati sulle pareti, sugli abbeveratoi e sulle mangiatoie. Ogni campionamento per capannone prevedeva il controllo di non meno di 20 mangiatorie e 50 abbeveratoi distribuiti lungo la lunghezza del capannone e almeno 10 m lineari di parete in prossimità della lettiera. Nel contempo venivano anche raccolte delle feci fresche direttamente dalla lettiera, con particolare attenzione a recuperare feci ciecali, ed inserite in sacchetti sterili. Ogni campionamento prevedeva l'acquisizione di almeno 50 feci per capannone. Per ogni ciclo di allevamento, sono stati raccolti e utilizzati in totale 126 campioni (42 campioni di mangiatoie/abbeveratoi, 42 campioni di pareti dei capannoni e 42 campioni fecali). I tamponi e i campioni fecali, una volta raccolti venivano messi in un frigorifero portatile collegato alla presa elettrica dell'auto e trasportati a temperatura controllata in laboratorio nel più breve tempo possibile (circa 2 ore di viaggio). L'isolamento di Campylobacter è stato eseguito sia con la metodica ISO 10272-1 che la procedura microbiologica suggerita dall'O.I.E. (2008).

Una selezione delle colonie con i caratteri tipici di *Campylobacter* termofili, precedentemente isolate tramite tecniche colturali, sono state sottoposte ad analisi mediante PCR per identificare la prevalenza delle due specie principali: *Campylobacter jejuni* e *C. coli*. La metodica utilizzata ha seguito il protocollo proposto da Denis *et al.* (2001).

RISULTATI

I ripetuti campionamenti hanno permesso di rilevare la presenza di *Campylobacter* termofili in tutti i capannoni ed in entrambi i cicli monitorati. I risultati sono riportati in tabella I che mostra come nel primo ciclo di allevamento le prime positività, nelle feci, si sono riscontrate nel capannone 2 già a partire dai 14 gg di età mentre nel II ciclo l'infezione è avvenuta una settimana più tardi. Nel I ciclo la contaminazione delle strutture (mangiatoie e abbeveratoi) sembra essere avvenuta intorno alla 4 settimana di allevamento mentre nel ciclo successivo alla 5 settimana. Poche positività si sono riscontrate nelle pareti dei capannoni (fig. 1).

L'identificazione di specie ha permesso di rilevare la presenza di *Campylobacter coli* nel I ciclo e *Campylobacter jejuni* e *C. coli* nel secondo ciclo campionato

DISCUSSIONE

La scelta di campionare questo allevamento era data da positività delle carcasse prelevate al macello su polli provenienti da questo sito di produzione nei cicli precedenti. Una potenziale fonte di *Campylobacter*, infatti, è la presenza di un precedente gruppo di animali positivi al patogeno nello stesso capannone in allevamento. Il *Campylobacter* da un gruppo positivo si diffonde ampiamente in allevamento e nelle zone intorno ad esso. Di conseguenza, il rischio di infettare il successivo gruppo è direttamente correlato all'efficienza di pulizia e disinfezione del capannone e alla distanza temporale tra l'uscita del primo gruppo di polli e l'introduzione del secondo gruppo (vuoto sanitario). Considerando i risultati del campionamento in allevamento in due cicli successivi, si può osservare che la presenza di *Campylobacter* è risultata decisamente superiore nei campioni fecali. Infatti, nelle altre tipologie di campioni (campioni di mangiatoia, abbeveratoio e parete) la presenza del microrganismo è risultata essere molto bassa. Tale fatto si presenta probabilmente a causa di una differenza nella carica di concentrazione di *Campylobacter* nelle varie tipologie di campione (il batterio si sviluppa meglio su alcuni substrati come il contenuto ciecale piuttosto che altri e, quindi, il ritrovamento e l'isolamento risultano difficoltosi). Nel nostro caso si è assistito, nel I ciclo controllato, un'infezione precoce; è noto che per infettare un pollo siano necessarie anche solo 35 cfu di *C. jejuni*. Dopo l'ingestione, il batterio raggiunge il cieco e si moltiplica velocemente entro ventiquattro ore dal'ingresso (Coward *et al.*, 2008). Diversi Autori segnalano che la maggior parte dei gruppi di broilers viene colonizzato tra le due e quattro settimane di età (van Gerwe *et al.*, 2009), probabilmente a causa della presenza di anticorpi materni che rallentano l'infezione precoce (Sahin *et al.*, 2003). Negli allevamenti di polli esistono molteplici potenziali fonti di infezione per quanto riguarda questi batteri, infatti, essi possono persistere e moltiplicarsi in svariati ospiti e possono sopravvivere in alcuni ambienti (Lyngstad *et al.*, 2008).

Alcuni fattori di rischio sono spesso coinvolti indipendentemente dal paese considerato o dalla solidità del disegno di studio. Questi fattori primari includono la stagione, l'aumentare dell'età di macellazione, la mancanza o carenza nei sistemi di biosicurezza, il diradamento (soltanto parziale), la presenza di gruppi di varie età in azienda, l'allevamento di specie diverse e l'utilizzo di una stabulazione di tipo estensivo (parzialmente all'aperto). Altri fattori

di rischio sono implicati in modo più discontinuo. Questi includono l'uso di acqua non potabile, la mancanza di consapevolezza dell'allevatore per quanto riguarda l'importanza di biosicurezza, l'utilizzo di antibiotici e la presenza di insetti o parassiti. Questi fattori di rischio secondari possono essere correlati maggiormente alla gestione di pratiche specifiche o addirittura alla posizione geografica. Nel nostro caso si potrebbe pensare ad una carenza nelle disinfezioni tra un ciclo e l'altro anche se le strutture si sono dimostrate positive solo successivamente all'infezione negli animali, alla presenza comunque di altre specie di allevamento (bufali) potenzialmente portatori così come carenze nelle biosicurezze (portoni aperti a luglio e agosto per facilitare la ventilazione che permettono l'entrata di volatili selvatici e di insetti). Sicuramente i cicli da noi seguiti dovrebbero avere la prevalenza maggiore in quanto la temperatura esterna calda favorisce la colonizzazione come dimostrato da diversi Autori (Jore *et al.*, 2010). Anche le strutture di allevamento come abbeveratoi e mangiatorie sono risultate contaminate; queste osservazioni sono confermate anche da Cox e Pavic, (2009) che hanno notato ad es., come gli abbeveratoi nipples con raccogli goccia sono più spesso contaminati rispetto a quelli senza.

Un allevamento di tipo convenzionale, essendo moderno, ben tenuto e possedendo un accesso limitato, dovrebbe essere considerato sicuro dal punto di vista della trasmissione di malattie infettive. Se le misure di biosicurezza non sono rigorosamente e costantemente attuate, come potrebbe essere il nostro caso, il *Campylobacter*, o come altri agenti patogeni, viene trasportato dall'esterno all'interno dell'allevamento per poi diffondersi tra gli animali e perpetuare la contaminazione nei cicli successivi

CONCLUSIONI

La campylobatteriosi di origine alimentare è la zoonosi più frequente nei paesi industrializzati. I broilers sono comunemente considerati come l'ospite naturale dei *Campylobacter* termofili e il consumo di carne contaminata, la principale fonte delle tossinfezioni alimentari umane. Il pulcino nasce senza *Campylobacter* a livello intestinale ma dopo 10-14 giorni inizia ad infettarsi a causa della presenza di questi batteri a livello ambientale. Questo si traduce in una elevata contaminazione delle carcasse durante le procedure di macellazione. La prevenzione di questa contaminazione deve iniziare con interventi volti a limitare la colonizzazione intestinale da *Campylobacter* già a partire dagli allevamenti che devono adottare misure di controllo specifiche soprattutto a livello di biosicurezza. In accordo con quanto affermato da Hermans *et al.* (2011), sono necessari ulteriori studi che meglio mettano in evidenza i punti deboli dell'allevamento che devono essere maggiormente controllati per impedire o limitare l'infezione.

BIBLIOGRAFIA

1. Cox J.M., Pavic A., 2009. Advances in enteropathogen control in poultry production. *J. Appl. Microbiol.* 108:745–755. 35
2. Coward C., van Diemen P.M., Conlan A.J.K., Gog J.R., Stevens M.P., Jones M.A., Maskell D.J., Competing isogenic *Campylobacter* strains exhibit

variable population structures in vivo. *Appl Environ Microbiol* 2008, 74:3857-3867.

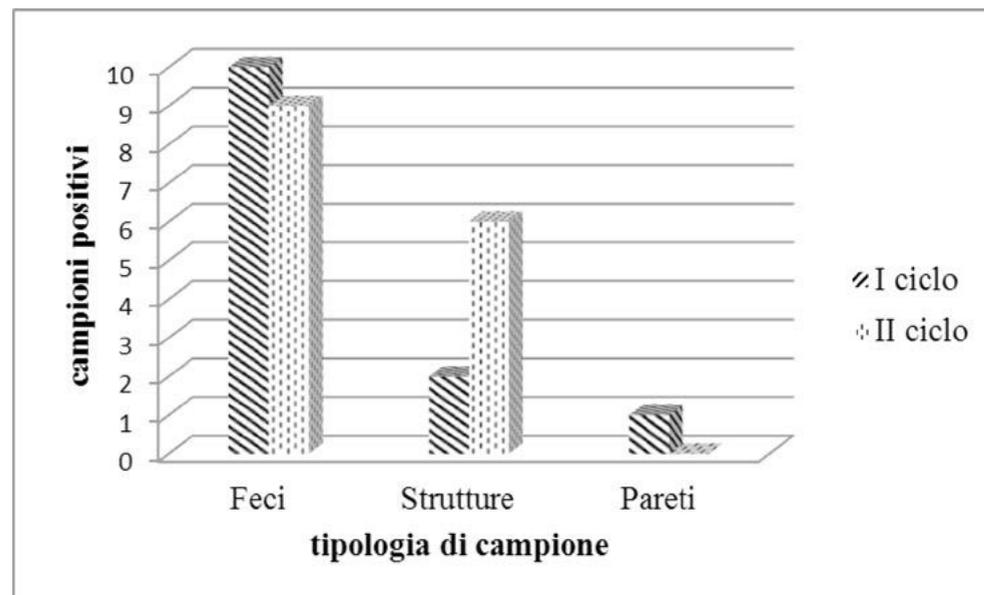
3. Denis M., Refregier-Petton, J., Laisney, M.J., Ermel, G., Salvat, G. (2001) *Campylobacter* contamination in French chicken production from farm to consumers. Use of a PCR assay for detection and identification of *Campylobacter jejuni* and *Camp. coli*. *Journal of Applied Microbiology* 91, 255–267.
4. Hermans D., Van Deun K., Messens W., Martel A., Van Immerseel F., Haesebrouck F., Rasschaert G., Heyndrickx M., Pasmans F., *Campylobacter* control in poultry by current intervention measures ineffective: urgent need for intensified fundamental research. *Vet Microbiol.* 2011 Sep 28;152(3-4):219-28.
5. Jore S, Viljugrein H, Brun E, Heier BT, Borck B, Ethelberg S, Hakkinen M, Kuusi M, Reiersen J, Hansson I, Engvall EO, Løfdahl M, Wagenaar JA, van Pelt W, Hofshagen M. Trends in *Campylobacter* incidence in broilers and humans in six European countries, 1997–2007. *Prev Vet Med* 2010;93:33–4
6. International Standard ISO 10272-1. Microbiologia degli alimenti e dei mangimi animali — Metodo orizzontale per il rilevamento e l'enumerazione di *Campylobacter* spp.
7. Lyngstad T. M., Jonsson M. E., Hofshagen M., Heier B. T., Risk Factors Associated with the Presence of *Campylobacter* Species in Norwegian Broiler Flocks. *2008 Poultry Science* 87:1987–1994
8. Sahin O, Luo N, Huang S, Zhang Q: Effect of *Campylobacter*-specific maternal antibodies on *Campylobacter jejuni* colonization in young chickens. *Appl Environ Microbiol* 2003, 69:5372-5379.
9. Stern NJ, Bailey JS, Blankenship LC, Cox NA, McHan F: Colonization characteristics of *Campylobacter jejuni* in chick ceca. *Avian Dis* 1988, 32:330-334
10. Tustin J., Laberge K., Michel P., Reiersen J., Daðadóttir S., Briem H., Hardardóttir H., Kristinsson K., Gunnarsson E., Fridriksdóttir V., Georgsson E., A national epidemic of campylobacteriosis in Iceland, lessons learned. *Zoonoses Public Health.* 2011 Sep;58(6):440-7.
11. van Gerwe T, Miflin JK, Templeton JM, Bouma A, Wagenaar JA, Jacobs-Reitsma WF, Stegeman A, Klinkenberg D: Quantifying transmission of *Campylobacter jejuni* in commercial broiler flocks. *Appl Environ Microbiol* 2009, 75:625-628

Tab. 1. Risultati degli isolamenti nelle varie matrici campionate in allevamento

		I ciclo di allevamento	II ciclo di allevamento
Numero campionamento	Data campionamento/età animali	Campioni positivi a <i>Campylobacter termofili</i>	Campioni positivi a <i>Campylobacter termofili</i>
1	1 gg	-	-
2	7 gg	-	-
3	14 gg	2F	-
4	21 gg	2F	1F
5	28 gg	1F, 2F, 3S	1F, 2F,
6	35 gg	1F, 1P, 2F, 2S, 3F	1F, 1S, 2F, 2S, 3F, 3S
7	42 gg	1F, 2F, 3F	1F, 1S, 2F, 2S, 3F, 3S

Legenda: F= feci; S= strutture; P= pareti – i numeri sono riferiti ai rispettivi capannoni

Figura 1: Distribuzione di *Campylobacter termofili* nelle tre tipologie di campioni prelevati



UTILIZZO DI ALCUNI ESTRATTI VEGETALI NEL BROILER: INFLUENZA SULLO STATO SANITARIO E SULLE PERFORMANCES PRODUTTIVE

USE OF VARIOUS VEGETABLE EXTRACTS ON BROILER CHICKENS: INFLUENCE ON STATE OF HEALTH AND ON PRODUCTION PERFORMANCES

Grilli G.¹, Pasini G.¹, Calligarich C.¹, Guffanti P.², Ferrante V.², Facchetti G.³, Fasoli P.³, Pradella G.⁴, Colnago G.⁵

¹ Università degli Studi di Milano, Dip. di Medicina Veterinaria, via Celoria 10, 20133Milano;

² Università degli Studi di Milano, Dip. Scienze e Politiche Ambientali;

³ Avicola Monteverde, Brescia. ⁴ Veterinario Libero professionista; ⁵ Zaluvida Company, Malaysia.

Summary

The purpose of this experiment is to evaluate the effects of an additive containing plant extracts such as green tea (*Camellia sinensis*) and pomegranate (*Punica granatum*), rich in polyphenols, on the growth and health performance of broiler chickens.

The trial involved 46,000 ROSS hybrid broiler chickens (male and female) divided between 4 sheds, 2 of which were controlled and 2 which were treated with plant extracts administered at a dosage of 20 g/q of water from the second day of life for 5 consecutive days and then at a dose of 200 g/q of water for 3 consecutive days before each dietary change (from day 10 to day 12, from day 19 to day 21). Weight, mortality, and ICA showed no difference between the groups while the oocyst emission was statistically reduced in the groups treated with plant extracts ($P < 0.01$), showing maximum emission peaks at 28 days of life of 25,000 opg against 50,000 opg detected in the controlled group.

INTRODUZIONE

Con il 1 gennaio 2006 sono stati proibiti gli antibiotici promotori di crescita. Questi antibiotici avevano permesso, negli anni passati, di ottenere ottimi risultati produttivi, in particolare grazie alla loro azione benefica sul tratto digerente; per contro, il loro utilizzo prolungato, ha portato all'insorgenza di alcuni problemi quali lo sviluppo di batteri resistenti ai farmaci (Sorum e Sunde, 2001), la presenza di residui antibiotici nelle carni avicole e uno squilibrio della normale microflora intestinale (Andremont, 2000).

Con la proibizione del loro utilizzo, la ricerca si è indirizzata sempre di più su molecole alternative totalmente naturali, che potessero, in qualche modo, svolgere funzioni simili. L'attenzione è focalizzata, in particolare, sui metaboliti secondari delle piante, ovvero composti presenti solo in specifici organismi o gruppi di organismi. Le principali classi di metaboliti secondari comprendono: polichetidi e acidi grassi, fenoli, terpeni e steroidi, fenil propanoidi, alcaloidi, amminoacidi e peptidi specializzati, carboidrati specializzati (Hanson, 2003).