



# UNIVERSITÀ DI PARMA

Dipartimento di Scienze Medico-Veterinarie

Corso di Laurea Magistrale a ciclo unico in Medicina Veterinaria

## **CAMPYLOBACTER TERMOTOLLERANTI NELLA FILIERA DEL POLLO DA CARNE, STRATEGIE DI CONTROLLO E RISCHIO PER IL CONSUMATORE**

**THERMOTOLERANT *CAMPYLOBACTER* IN THE BROILER CHAIN, CONTROL  
STRATEGIES AND RISK FOR THE CONSUMER**

Relatore:

Chiar.ma Prof.ssa *Silvia Bonardi*

Laureanda:

*Arianna Zilocchi*

ANNO ACCADEMICO 2020/2021

## Sommario

ABSTRACT .....	4
RIASSUNTO .....	5
Introduzione .....	6
1. Il genere <i>Campylobacter</i> .....	8
1.1 Tassonomia .....	9
1.2 Epidemiologia .....	12
2. Le specie di <i>Campylobacter</i> termotolleranti .....	14
2.1 Principali forme cliniche negli animali .....	16
2.2 Limiti per la crescita di <i>Campylobacter</i> termotolleranti .....	17
3. Il ruolo del pollo nell'epidemiologia della campilobatteriosi .....	20
3.1 Specie e serbatoi animali .....	20
3.2 Trasporto dei volatili al macello .....	23
3.3 Macellazione: fasi a rischio .....	24
3.4 Alimenti a rischio e cross contaminazione .....	28
4. La campilobatteriosi nell'Unione europea .....	33
4.1 Patogenesi .....	35
4.2 Quadri clinici nell'uomo .....	38
4.2.1. <i>Campylobacter</i> e la sindrome di Guillan – Barré .....	39
5. Strategie di prevenzione .....	41
5.1 Strategie di prevenzione nell'allevamento di polli da carne .....	41
5.1.1 Biosicurezza .....	42
5.1.2 Barriere igieniche .....	43
5.1.3 Zanzariere .....	43
5.1.4 Acqua di bevanda .....	44
5.1.5 Riduzione dell'età di macellazione .....	44

5.1.6	Variazione nel numero di capi del capannone.....	45
5.1.7	Batteriocine .....	45
5.1.7	Batteriofagi .....	46
5.1.8	Vaccinazione .....	47
5.1.9.	Allevamento selettivo .....	48
5.2	Strategie di prevenzione durante il trasporto e nelle fasi prima della macellazione.....	49
5.3	Strategie di prevenzione durante la macellazione, la preparazione e la lavorazione delle carni.....	51
5.3.1	Prevenzione della fuoriuscita del contenuto intestinale .....	51
5.3.2	Macellazione programmata.....	52
5.3.3	Macellazione logistica.....	52
5.3.4	Decontaminazione .....	53
5.4	Strategie di prevenzione per l'uomo .....	54
5.5	Criteri microbiologici.....	57
6.	Definizione di alimenti a rischio secondo la normativa europea .....	61
6.1	Rintracciabilità degli alimenti.....	62
6.2	Ritiro e richiamo .....	63
7.	Conclusioni .....	64
	Bibliografia.....	66
	Sitografia.....	85

## ABSTRACT

*Campylobacteriosis* is the most commonly reported gastrointestinal infection in humans in the EU and has been so since 2005. In 2019, *Campylobacter* was the third most frequently reported causative agent of food-borne outbreaks at EU level by 18 Member States, with 319 outbreaks reported to EFSA, involving 1,254 cases of illness, 125 hospitalisations and no deaths.

The genus *Campylobacter* includes 32 species. Within the genus *Campylobacter*, thermotolerant *Campylobacter* species, particularly *C. jejuni* subsp. *jejuni* and *C. coli*, are the most frequently associated with food-borne infections and the human illness called campylobacteriosis. Mainly, the infection is self-limiting and manifests as an enteric disease, although some outbreaks have been also reported and complications such as the Guillain–Barrè Syndrome can sporadically appear.

This thesis reviews the sources, transmission routes, mechanisms, and strategies used by *Campylobacter* to persist in the food chain, i.e. from farm to fork. In particular, it deals with the role of broilers as the most important reservoir of *Campylobacter* and the main routes of transmission of the microorganism to consumers.

Additionally, different strategies are recommended for application along the poultry food chain to avoid the public health risk associated with this pathogen. Specifically, they range from consumer education to the handling and domestic consumption of poultry meat to the different stages of the broiler production chain such as biosecurity on farm, transport of animals to the slaughterhouse, correct procedures and hygiene rules during slaughtering and meat processing.

Finally, the microbiological criterium concerning thermotolerant *Campylobacter* in broilers after slaughtering has been recently added to the microbiological criteria laid down by the European legislation. Besides the microbiological controls, the definition of “food at risk” and the procedures for traceability and withdrawal from the market have been described.

## RIASSUNTO

La campilobatteriosi è l'infezione gastrointestinale più comunemente segnalata nell'uomo nell'UE dal 2005. Nel 2019 *Campylobacter* è stato il terzo agente causale maggiormente segnalato nella UE di focolai di malattia a trasmissione alimentare, con un totale di 319 focolai, 1.254 casi di malattia, 125 ricoveri e nessun decesso.

Il genere *Campylobacter* comprende 32 specie. All'interno del genere *Campylobacter*, le specie di *Campylobacter* termotolleranti, in particolare *C. jejuni* subsp. *jejuni* e *C. coli*, causano più frequentemente infezioni food-borne e la malattia nell'uomo chiamata campilobatteriosi. Principalmente l'infezione è autolimitante e si manifesta come una patologia enterica, sebbene siano stati segnalati anche alcuni casi sporadici di complicazioni, come la sindrome di Guillain-Barrè.

la presente tesi di laurea esamina le fonti, le vie di trasmissione, i meccanismi e le strategie utilizzate da *Campylobacter* per persistere nell'intera catena alimentare, dall'allevamento alla tavola del consumatore. In particolare, l'interesse si concentra sul ruolo del pollo da carne in quanto serbatoio più importante di *Campylobacter* e principale veicolo di trasmissione all'uomo.

Inoltre, vengono descritte le fasi a rischio e le diverse strategie da applicare per evitare rischi per la salute pubblica associati al patogeno, dall'educazione del consumatore alla manipolazione e consumo domestico di carni avicole alle diverse fasi della filiera produttiva del pollo da carne, quali biosicurezza in allevamento, trasporto degli animali in macello, corrette procedure e norme igieniche durante le fasi di macellazione e preparazioni delle carni.

Si prende in considerazione, infine, la normativa sui criteri microbiologici relativi a *Campylobacter* nel pollo da carne, definendo anche cosa intenda la normativa europea per alimento a rischio e quali siano le procedure per la tracciabilità e per il ritiro/richiamo degli alimenti.

## Introduzione

I *Campylobacter spp.* sono batteri Gram-negativi, appartenenti alla famiglia delle *Campylobacteriaceae*. Alcune specie di *Campylobacter*, in base a specifiche caratteristiche di crescita, vengono definite termotolleranti; a queste appartengono anche le specie responsabili di infezioni food-borne e della malattia umana chiamata campilobatteriosi, quali *Campylobacter jejuni* (la più frequente) e *Campylobacter coli*.

La campilobatteriosi è l'infezione gastrointestinale più comunemente segnalata nell'uomo nell'UE dal 2005. Nel 2019 *Campylobacter* è stato il terzo agente causale maggiormente segnalato nella UE di focolai di malattia a trasmissione alimentare, con un totale di 319 focolai, 1.254 casi di malattia, 125 ricoveri e nessun decesso (EFSA e ECDC, 2021).

Il ruolo dei serbatoi animali nella campilobatteriosi è molto importante. *Campylobacter spp* è un batterio commensale del tratto gastrointestinale di molti animali selvatici, animali da allevamento (bovini, piccoli ruminanti e suini) e animali da compagnia (cani e gatti). Tuttavia, i serbatoi più importanti sono rappresentati dalle specie aviarie adatte al consumo umano, come il pollo e il tacchino, oltre ad anatra, oca e quaglia (Damborg et al., 2004; Thakur e Gebreyes, 2005).

La trasmissione del microorganismo avviene per via oro-fecale attraverso l'ingestione di cibo e acqua contaminati (Facciola et al., 2017). Tra gli alimenti a rischio, si segnalano principalmente le carni poco cotte di pollo e tacchino, data la diffusione del patogeno nel tratto intestinale degli animali e la facilità della contaminazione delle carni all'atto della macellazione (Colavita, 2012).

Per controllare la diffusione del microorganismo è necessario intervenire in diverse fasi della filiera produttiva del pollo da carne: dal livello di biosicurezza in allevamento, al trasporto degli animali al macello, al rispetto di corrette procedure e norme igieniche durante le fasi di macellazione e preparazione delle carni. Inoltre, è molto importante l'educazione del consumatore alla manipolazione e consumo domestico di carni avicole (EFSA, 2011).

Nell'uomo la maggior parte delle infezioni da *Campylobacter* è sporadica e autolimitante, si manifesta come una patologia enterica caratterizzata da diarrea infiammatoria acquosa (talvolta emorragica) con dolori addominali, vomito e febbre ondulante. Tuttavia, *Campylobacter* è stato associato anche alla Malattia Infiammatoria Intestinale (IBD), esofago di Barrett e cancro del colon-retto; può, inoltre, essere responsabile di problemi non gastrointestinali a cui seguono

danni a lungo termine per il paziente come nel caso della sindrome di Guillain-Barrè, artrite immuno-mediata e artrite reattiva (García-Sánchez et al., 2018; Nachamkin et al., 1998; Helms et al., 2006; Dooruyn et al., 2008).

Nonostante l'incidenza della campilobatteriosi umana nell'Unione Europea, il Regolamento (CE) n. 2073/2005, che stabilisce dei criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari, non prevedeva un criterio per *Campylobacter spp.* sulle carcasse di polli carne. Questa lacuna è stata colmata nel 2017 con l'entrata in vigore del Regolamento (UE) 2017/1495 ha introdotto il criterio di igiene di processo per *Campylobacter* nelle carcasse di polli da carne. Il controllo in macello della contaminazione da *Campylobacter* può rappresentare un utile strumento per limitare la diffusione di questa importante zoonosi a trasmissione alimentare.

## 1. Il genere *Campylobacter*

La famiglia delle *Campylobacteriaceae* comprende tre generi distinti: *Campylobacter*, *Arcobacter* e *Helicobacter*, batteri commensali nell'uomo e negli animali domestici.

Il genere *Campylobacter* comprende 32 specie, di cui le più note sono *C. jejuni* e *C. coli*, le principali responsabili della gastroenterite nell'uomo, sebbene altre specie come *C. concisus*, *C. upsaliensis*, *C. ureolyticus*, *C. hyointestinalis* e *C. sputorum*, considerate ora "emergenti", sono state associate a gastroenterite e parodontite. Tutte queste specie colonizzano normalmente diversi apparati di animali selvatici e si trovano in molti alimenti di origine animale (Fitzgerald e Nachamkin, 2011; Man, 2011).

Il genere *Campylobacter*, dal greco *kampylos* che significa "curvato", è composto da piccoli batteri Gram-negativi, non sporigeni, con dimensioni variabili di lunghezza compresa tra 0,5 e 5  $\mu\text{m}$  e larghezza compresa tra 0,2 e 0,9  $\mu\text{m}$ , a forma di virgola, ossidasi e catalasi positivi (Vandamme et al., 2005).

La maggior parte della specie è mobile ed è caratterizzata da un movimento a spirale causato da un flagello polare presente su una o entrambe le estremità della cellula. Le uniche eccezioni sono *Campylobacter gracilis*, che è immobile, e *Campylobacter showae* che ha più flagelli. I flagelli possono avere una lunghezza due o tre volte superiore a quella della cellula (Debruyne et al., 2008).

Quando due o più cellule batteriche sono raggruppate insieme, formano una "S" o una "V" a forma di ali di gabbiano.

Le dimensioni del batterio sono molto ridotte e variano da 0,3 a 0,6  $\mu\text{m}$  di diametro; proprio grazie alle loro dimensioni riescono a passare attraverso filtri con pori di 0,45  $\mu\text{m}$  di diametro dove altri batteri invece rimangono trattenuti (Murray et al., 2003).

Sono chemio-organotrofi, ma non attaccano i carboidrati né per via fermentativa né per via assimilativa; come fonte di energia utilizzano gli aminoacidi o i composti dei cicli intermedi dell'acido tricarbossilico; non idrolizzano l'urea, riducono i nitrati e non elaborano pigmenti, inoltre riducono il fumarato a succinato e producono acetoina e indolo (Colavita et al., 2012).

Nonostante si tratti di microrganismi non sporigeni, possono formare strutture coccoidi qualora si trovino in ambiente sfavorevole o in colture esposte all'aria per lungo periodo (Vandamme et al., 2005).

I batteri del genere *Campylobacter* crescono meglio in un'atmosfera a bassa percentuale d'ossigeno (dal 5 al 7 %; sono pertanto microaerofili) e ad un'elevata percentuale di anidride carbonica (dal 5 al 10 %). Raramente sono in grado di crescere in condizioni di aerobiosi o anaerobiosi ma, per ottenere colture ottimali, si utilizzano generalmente miscele composte da 5% di ossigeno, 10% di anidride carbonica e 85% di azoto (Fitzgerald e Nachamkin, 2011).

Crescono bene quindi in un'atmosfera in cui la tensione dell'ossigeno è ridotta: questo riflette le condizioni a livello intestinale, sede d'elezione del batterio, però rappresenta una difficoltà per l'isolamento in laboratorio. Dato che nei comuni termostati le condizioni aeree sono normali con una tensione dell'O<sub>2</sub> al 21%, è necessario utilizzare degli incubatori appositi, detti termostati a CO<sub>2</sub>, in cui la tensione di CO<sub>2</sub> sia superiore rispetto a quella dell'O<sub>2</sub>. L'isolamento di *Campylobacter* da campioni clinici, principalmente campioni fecali, comporta la piastratura diretta del campione (non arricchito) su terreni selettivi, che impedisce la crescita eccessiva di altri batteri e l'uso di un ambiente microaerobico (5% O<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub>, 85 % N<sub>2</sub>). La maggior parte dei laboratori clinici coltiva regolarmente campioni di feci per *Campylobacter* utilizzando condizioni che favoriscono l'isolamento di *C jejuni* e *C coli*; nessun metodo di coltura attualmente disponibile è specifico per tutte le specie di *Campylobacter* (Fitzgerald C., 2015).

## 1.1 Tassonomia

La classificazione dei batteri appartenenti al genere *Campylobacter* ha subito diversi cambiamenti dal periodo della loro iniziale scoperta. Questo genere, assieme ad *Helicobacter* e *Arcobacter*, appartiene alla famiglia delle *Campylobacteriaceae* (precedentemente denominate Spirillaceae).

Il genere *Campylobacter* comprende 32 specie (Costa e Iraola, 2019), di cui le maggiormente conosciute sono *C. jejuni* e *C. coli*, principali responsabili di gastroenterite nell'uomo, nonostante altre specie, come *C. concisus*, *C. upsaliensis*, *C. ureolyticus*, *C. hyointestinalis* e *C. sputorum*, considerate ora "emergenti", siano state associate a disturbi gastrointestinali quali malattie infiammatorie intestinali (IBD), gastroenterite e periodontite (Fitzgerald e Nachamkin, 2011; Man, 2011).

Tutte queste specie colonizzano normalmente diversi apparati degli animali domestici o selvatici e si possono trovare in numerosi prodotti di origine animale (Man, 2011).

Tabella 1 Principali specie di *Campylobacter* e rispettive nicchie ecologiche (modificata da Man et al., 2011)

<b>CAMPYLOBACTER spp.</b>	<b>NICCHIA ECOLOGICA O SEDE D'ISOLAMENTO</b>
<i>C. avium</i>	Pollo e tacchino (contenuto cecale)
<i>C. canadensis</i>	Gru americana (tamponi cloacali)
<i>C. coli</i> *	Bovino (bile, feci, intestino, letame); pollo (fegato, cieco, digiuno, milza, feci); cane (feci); anatra (contenuto cecale); capra (feci, latte); scimmia (feci); suino (feci, ileo terminale, retto); pecora (cistifellea); tacchino, gabbiano
<i>C. concisus</i> *	Gatto (saliva); cane (feci)
<i>C. cuniculorum</i>	Coniglio (contenuto cecale)
<i>C. curvus</i> *	Cane (feci)
<i>C. fetus subsp. fetus</i> *	Bovino (feci, feti, sperma, utero, muco vaginale, letame); cavallo (feci), canguro (piccolo intestino); tartarughe "pet" (feci); pecore (feci, feti, encefalo dei feti)
<i>C. fetus subsp. venerealis</i> *	Bovino (muco vaginale, prepuzio, feti)
<i>C. gracilis</i> *	Cane (feci)
<i>C. helveticus</i> *	Gatto (feci); cane (feci)
<i>C. hyointestinalis</i> * (subsp. <i>Hyointestinalis</i> e <i>lawsonii</i> )	Bovino (feci e composti del letame); cane (feci); hamster (intestino); suino (stomaco, intestino, feci); renna (feci); pecora (feci)
<i>C. jejuni</i> * (subsp. <i>doylei</i> e <i>jejuni</i> )	Bovino (bile, feci, intestino, letame, feti); pollo (feci); cane (feci); anatra (contenuto cecale); capra (latte, feci); pecora (cistifellea); scimmie (feci); elefante marino (retto)
<i>C. lanienae</i>	Bovino (feci); suino (feci); pecora (feci)
<i>C. lari</i> *	Bovino (feci, intestino); pollo (feci); cane (feci, saliva); anatra (feci); puledro e cavallo adulto (feci); pecora (feci); gufo comune (feci); elefante marino (retto); macaco Rhesus, uccelli selvatici
<i>C. mucosalis</i> *	Cane (feci)
<i>C. rectus</i> *	Cane (feci)
<i>C. showae</i> *	Cane (feci)
<i>C. sputorum</i> *	Cane (feci); bovino (feci e sperma); suino (feci); pecora (feci, feti) <i>C. troglodytis</i> Scimpanze (feci)
<i>C. upsaliensis</i> *	Gatto (feci); cane (feci)
<i>C. ureolyticus</i> *	Cavallo (endometrio)

\* *Campylobacter* spp. associati a zoonosi con manifestazioni gastroenteriche o extraintestinali.

Nell'immagine sottostante viene mostrato un albero filogenetico delle specie di *Campylobacter* che divide il genere in cinque gruppi distinti, vale a dire il gruppo *C. fetus*, il gruppo *C. jejuni*, il gruppo *C. lari*, il gruppo *C. concisus* e il gruppo *C. ureolyticus*. Le denominazioni sono state assegnate considerando le specie clinicamente più rilevanti all'interno di ciascun gruppo. Le etichette sono colorate in rosso per le specie documentate come causa di infezioni nell'uomo e/o in altri animali o in blu per le specie non documentate come causa di infezioni.

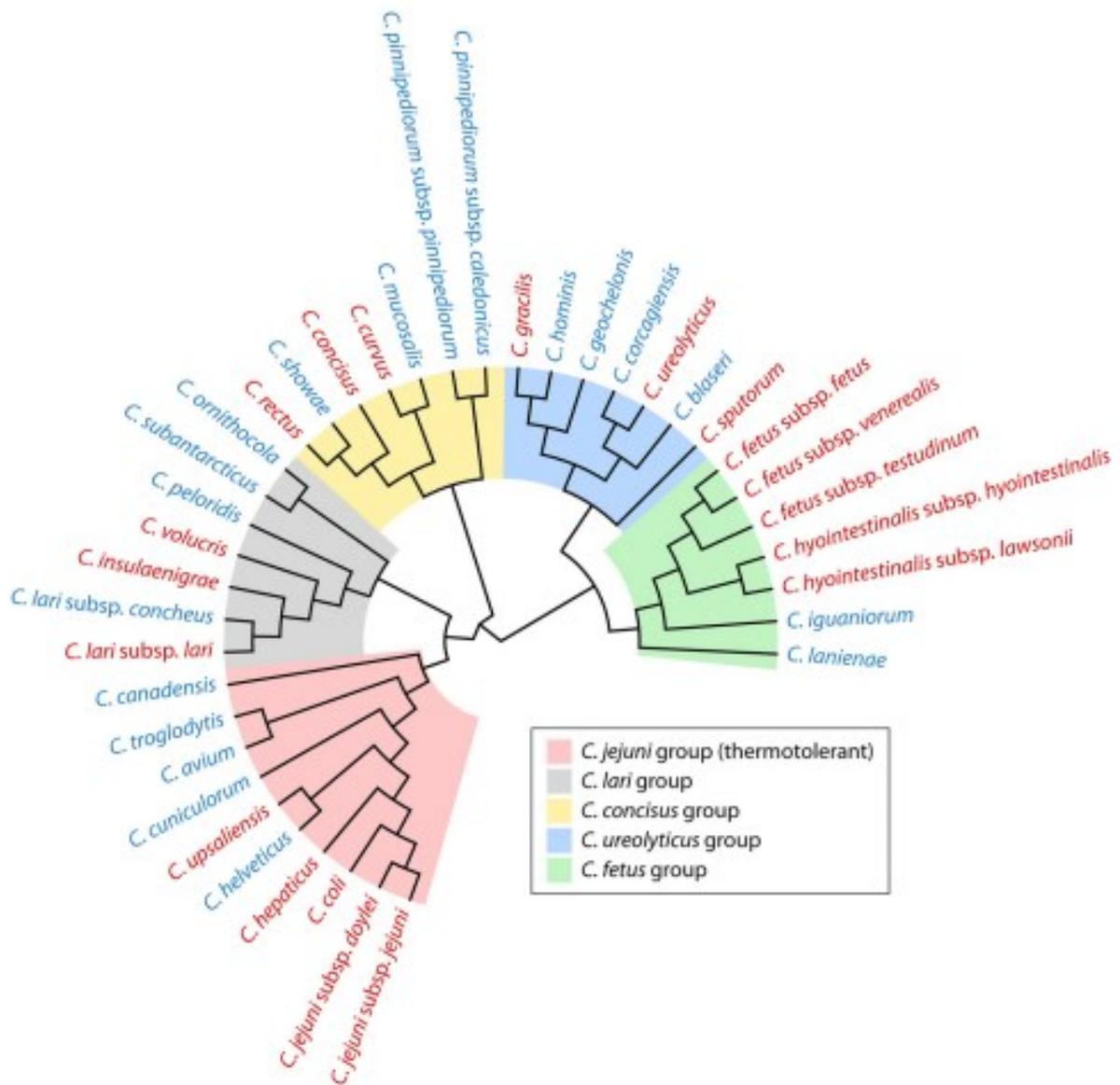


Figura 1 Relazioni filogenetiche tra le specie di *Campylobacter* descritte. (Costa D. & Iraola G., 2019)

## 1.2 Epidemiologia

I *Campylobacter* spp. hanno un habitat intestinale, ma si trovano anche negli organi riproduttivi e nella cavità orale dell'uomo e di animali a sangue caldo, come animali da reddito, domestici e selvatici; inoltre, dato che questi batteri possono essere diffusi dalle feci di animali portatori, possono essere ritrovati nel terreno e nelle acque. Il contagio nell'uomo può avvenire tramite alimenti o acqua contaminati (Colavita et al., 2012).

Per quanto riguarda i focolai di malattia a trasmissione alimentare, nel 2019 *Campylobacter* è stato il terzo agente causale maggiormente segnalato nella UE, dopo *Salmonella* e *Listeria monocytogenes*. È stato riportato da 18 Stati membri, con un totale di 319 focolai, 1.254 casi di malattia, 125 ricoveri e nessun decesso (EFSA e ECDC, 2021).

L'alimento più a rischio per la trasmissione di *Campylobacter* all'uomo è la carne di pollo. In uno studio del 2006, la prevalenza di contaminazione nella carne di pollo risultava variabile tra il 60% e l'80%. Tuttavia, anche la carne di tacchino (18,5%), latte vaccino crudo (12%), carni bovine e suine (rispettivamente 0,4% e 0,6%), molluschi (42%), frutta e verdura (0,23-0,36%) sono stati identificati come possibili cause di trasmissione (Bull et al., 2006).

La campilobatteriosi è l'infezione gastrointestinale più comunemente segnalata nell'uomo nella UE dal 2005. Nel 2019, il numero di casi confermati di campilobatteriosi umana è stato di 220.682, corrispondente a un tasso di notifica UE di 59,7 per 100.000 abitanti, indice di una diminuzione del 6,9% rispetto al tasso del 2018 (64,1 ogni 100.000 abitanti). Tra il 2015 e il 2019, c'è stata una chiara stagionalità nel numero di casi confermati di campilobatteriosi segnalati nella UE/SEE (Spazio Economico Europeo), con picchi nei mesi estivi e incremento dai primi mesi primaverili (marzo). I picchi invernali annuali, sebbene con numeri inferiori rispetto all'estate, sono stati osservati a gennaio di ogni anno dal 2012 al 2019.

La tendenza UE/SEE è rimasta stabile (piatta) nel periodo tra il 2015 e il 2019 (figura 2) (EFSA e ECDC, 2021).

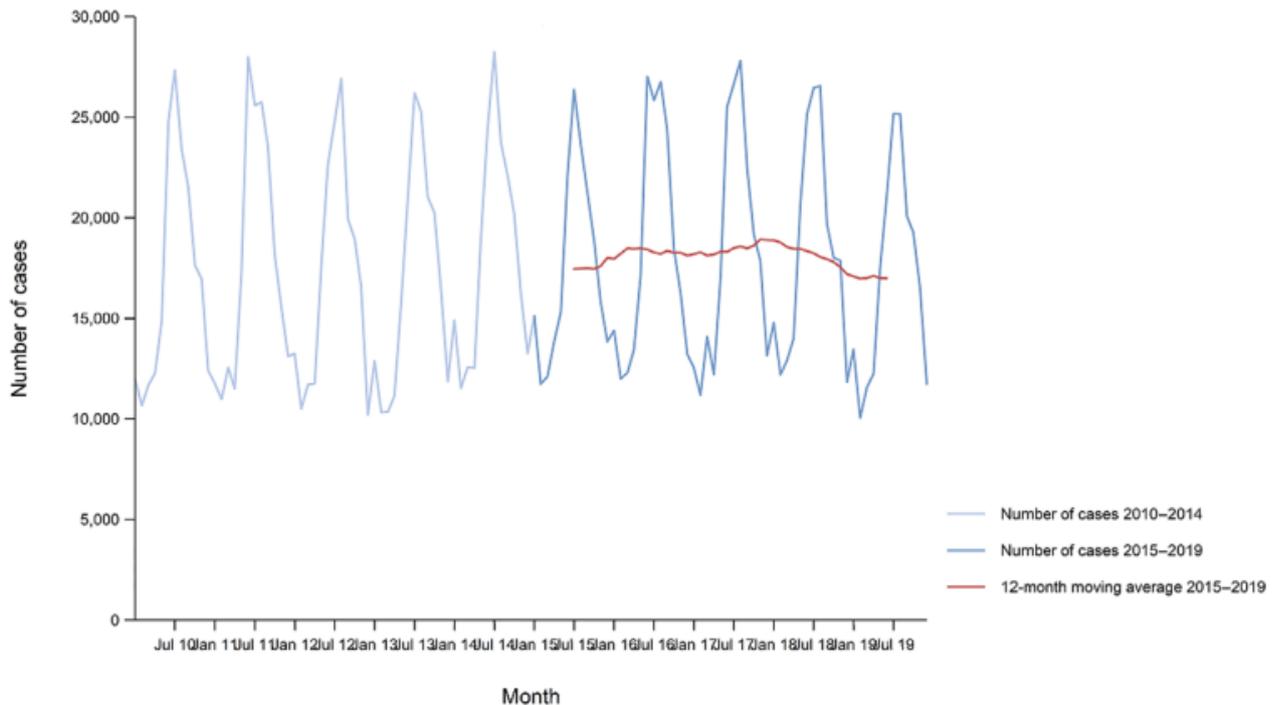


Figura 2 Trend in reported confirmed cases of human campylobacteriosis in the EU/EEA, 2015-2019 (EFSA and ECDC, 2021)

(Source: Austria, Belgium, Bulgaria, Cyprus, Czech Republic, Denmark, Estonia, Finland, France, Germany, Hungary, Iceland, Ireland, Italy, Latvia, Lithuania, Luxembourg, Malta, Netherlands, Norway, Poland, Slovakia, Slovenia, Spain, Sweden, and United Kingdom. Croatia and Romania did not report data over the whole period at the level of detail required for the analysis. Greece and Portugal do not have surveillance systems for this disease)

L'incidenza dell'infezione, inoltre, si manifesta con una distribuzione bimodale in base all'età: la maggiore incidenza si trova nei bambini fino circa a 6 anni e nei giovani/adulti dai 20 ai 40 anni (Fitzgerald e Nachamkin, 2011).

Il 95% dei casi di campilobatteriosi dell'uomo è attribuibile a *C. jejuni* e si manifesta con diarrea acuta, spesso contenente sangue e leucociti. L'infezione enterica si manifesta in modo sporadico, o come singoli episodi epidemici intrafamiliari, anche se non mancano segnalazioni di veri e propri focolai (Colavita et al., 2012)

Negli animali domestici, invece, *C. coli* e *C. jejuni* possono colonizzare l'intestino in gran numero senza apparenti manifestazioni cliniche per l'ospite, se si esclude talvolta la comparsa di feci molli e acquose con muco e tracce di sangue (Joens, 2004).

## 2. Le specie di *Campylobacter* termotolleranti

Le specie termotolleranti comprendono *Campylobacter jejuni* (la più frequente), *Campylobacter coli*, *Campylobacter lari*, *Campylobacter upsaliensis* e *Campylobacter helveticus* e sono gli agenti eziologici responsabili di infezioni food-borne e della malattia umana chiamata campilobatteriosi, sebbene specie non termotolleranti come *Campylobacter fetus* possano occasionalmente causare infezione nell'uomo (Forsythe, 2010).

Fin dalla definizione del genere *Campylobacter*, *C. jejuni* è stato riconosciuto come uno dei patogeni predominanti nell'eziologia della gastroenterite batterica. La maggior parte delle infezioni da *Campylobacter* comportano una gastroenterite lieve e autolimitante; la presentazione clinica generale comprende diarrea acquosa o sanguinolenta che ha durata media di 6 giorni, con oltre l'80% dei pazienti che riferiscono crampi addominali e febbre (Friedman et al., 2004; Lastovica e Skirrow., 2000).

La paralisi neuromuscolare acuta, dovuta alla demielinizzazione, chiamata sindrome di Guillain-Barré, e l'artropatia reattiva chiamata sindrome di Reiter possono rappresentare complicazioni rare della campilobatteriosi (Allos, 1997).

I pazienti generalmente guariscono dalla campilobatteriosi senza terapia antimicrobica, con un trattamento basato sulla reintegrazione degli elettroliti e sulla reidratazione. I casi gravi (ad esempio con febbre alta e/o con carenze della risposta del sistema immunitario) possono essere gestiti con antibiotici come tetraciclina e macrolidi o fluorochinoloni, ma l'aumento della resistenza agli antibiotici in *C. jejuni* e *C. coli* ha compromesso l'efficacia di queste terapie (Alfredson e Korolik, 2007).

Come detto in precedenza, i *Campylobacter* sono batteri micro-aerofili che sopravvivono e crescono al meglio in un ambiente caratterizzato da una bassa tensione di ossigeno (5% O<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub> e 85% N<sub>2</sub>) (Fitzgerald e Nachamkin, 2011; Garénaux et al., 2008).

Tutte le specie, eccetto *C. gracilis*, sintetizzano l'enzima ossidasi. Non fermentano né ossidano i carboidrati ma ottengono energia dal metabolismo di amminoacidi o dall'acido tricarbossilico (Debruyne et al., 2008).

Le specie *Campylobacter* *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis* e *C. helveticus* sono in grado di crescere a pH compreso tra 6,5 e 7,5 e a temperature comprese tra 37° e 42° C. Per questo motivo vengono definiti, da alcuni autori, "termofili". Tuttavia, questi microrganismi sono più

correttamente denominati “termotolleranti” poiché non presentano un vero e proprio tratto termofilo, non essendo in grado di crescere a temperature uguali o superiori 55°C (Levin, 2007). Inoltre, non sono in grado di crescere ad una temperatura inferiore a 30°C, per l'assenza dei geni che codificano per le proteine da shock termico che svolgono un ruolo nell'adattamento a basse temperature. Infine, è stato dimostrato che la crescita non si verifica in ambienti con valori di attività dell'acqua ( $a_w$ ) inferiori a 0,987 (il che corrisponde ad una concentrazione di sodio cloruro superiore al 2% p/v), mentre è ottimale se pari a 0,997 (circa 0,5% NaCl p/v) (De Cesare et al., 2003).

La tabella 2 mostra la divisione tra le specie di *Campylobacter* termotolleranti e classici.

Tabella 2 Elenco delle specie di *Campylobacter* termotolleranti e classici

TERMOTOLLERANTI	CLASSICI
<i>C. jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i> ( <i>C. jejuni</i> ) <i>C. jejuni</i> subsp. <i>doylei</i>	<i>C. fetus</i> <i>C. fetus</i> subsp. <i>fetus</i> <i>C. fetus</i> subsp. <i>venerealis</i>
<i>C. coli</i>	<i>C. hyointestinalis</i>
<i>C. lari</i>	<i>C. sputorum</i>
<i>C. upsaliensis</i>	<i>C. conciscus</i>
<i>C. helveticus</i>	<i>C. mucosalis</i>

La specie prevalente nei casi food-borne è *Campylobacter jejuni* di cui esistono due sottospecie, *C. jejuni* sottospecie *jejuni* (noto come *C. jejuni*) e *C. jejuni* subsp. *doylei* (Gundogdu e Wren, 2020). L'altra specie prevalente nelle malattie food-borne è *C. coli* (EFSA ed ECDC, 2021).

Nel “The European Union One Health 2019 Zoonoses Report” sono state raccolte le notifiche sulle specie di *Campylobacter* responsabili di zoonosi, fornite da 24 Stati membri, con i seguenti risultati: nel 55,2% dei casi di campilobatteriosi segnalati nella UE è stata identificata la specie responsabile, e precisamente, di questi, l'83,1% dei casi è attribuibile a *Campylobacter jejuni*, il 10,8% a *Campylobacter coli*, 0,1% a *Campylobacter lari*, 0,1% a *Campylobacter fetus* e 0,1% *Campylobacter upsaliensis*. Le non bene identificate "altre" specie di *Campylobacter* rappresentano il 5,8%, spesso tuttavia classificate e come «*C. jejuni/C. coli/C. lari* non differenziato» (EFSA e ECDC, 2021).

## 2.1 Principali forme cliniche negli animali

Le specie di *Campylobacter* termotolleranti, oltre ad essere responsabili di tossinfezione nell'uomo, sono patogene anche per gli animali.

*Campylobacter* è ampiamente distribuito in varie specie animali. Nella maggior parte delle specie esiste come commensale intestinale senza causare malattie cliniche, ma in alcune circostanze può indurre enterite localizzata o infezioni sistemiche. Le perdite riproduttive (ad esempio aborto e infertilità) nei ruminanti sono tra le condizioni cliniche più significative associate all'infezione da *Campylobacter*. *C. jejuni* e *C. fetus* subsp. *fetus* (CFF) sono le principali specie di *Campylobacter* associate a epidemie di aborti ovini in tutto il mondo e causano anche aborti sporadici nei bovini e nelle capre (Sahin et al., 2017). Entrambi i microorganismi si trovano frequentemente nell'intestino e nella cistifellea di animali sani; tuttavia, nelle pecore gravide infette può verificarsi la traslocazione di *Campylobacter* attraverso la mucosa intestinale e la diffusione sistemica, portando all'infezione feto-placentare e all'aborto, che in genere si verifica nel terzo trimestre di gestazione (Skirrow, 1994).

Storicamente, *C. fetus* subsp. *fetus* era la principale specie di *Campylobacter* associata agli aborti ovini in tutto il mondo, ma negli Stati Uniti si è verificato uno spostamento eziologico da *C. fetus* subsp. *fetus* a *C. jejuni*, dove la maggior parte degli aborti di pecore associati a *Campylobacter* sono ora attribuiti a un singolo clone di *C. jejuni* (Lei et al., 2020).

Nel bovino, l'infertilità infettiva, nota anche come campilobatteriosi genitale bovina, caratterizzata da infertilità, morte embrionale precoce e, in misura minore, aborto, è causata da *C. fetus* subsp. *venerealis* (CFV) ed è una malattia economicamente importante in tutto il mondo. Il batterio vive nel tratto genitale dei bovini ed è trasmesso per via venerea alle vacche da tori portatori (Lei et al., 2020).

*C. jejuni* è comunemente presente nel tratto intestinale dei polli come commensale. Tuttavia, una specie di *Campylobacter* recentemente identificata, *Campylobacter hepaticus*, ha dimostrato di causare la malattia del fegato a macchie (SLD) (Crawshaw, 2019). La malattia del fegato a macchie si manifesta come epatite infettiva acuta ed è caratterizzata da piccoli focolai necrotici multifocali sulla superficie del fegato. Colpisce principalmente i polli allevati all'aperto con una mortalità fino al 15% e una riduzione della produzione di uova del 35% (Lei et al., 2020).

Oltre agli animali da reddito, gli animali da compagnia (come cani e gatti) possono albergare varie specie di *Campylobacter* (principalmente *C. upsaliensis* e *C. jejuni*) nel loro tratto

gastrointestinale in maniera asintomatica, anche se *Campylobacter* occasionalmente si possono osservare casi di enterite, specialmente negli animali più giovani. *C. jejuni* è anche riconosciuto come una rara causa di aborto nei cani (Lei et al., 2020).

Tabella 3. Principali forme cliniche negli animali da *Campylobacter* termotolleranti

TERMOTOLLERANTI	FORME CLINICHE
<i>C. jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i> ( <i>C. jejuni</i> )	Mastite (bovina) Aborto (pecora) Enterite (suino, vitello, agnello, cane, gatto, furetto) Enterite (pulcini)
<i>C. coli</i>	Mastite (bovina) Enterite (suino)
<i>C. lari</i>	(ospite predominante: gabbiano)
<i>C. upsaliensis</i> <i>C. helveticus</i>	Enterite (cane, gatto)

## 2.2 Limiti per la crescita di *Campylobacter* termotolleranti

Le specie di *Campylobacter* termotolleranti sono in grado di crescere tra 37°C e 42°C, ma incapaci di crescere al di sotto dei 30°C (assenza di geni che codificano per le proteine da shock termico che svolgono un ruolo nell'adattamento alle basse temperature), con una temperatura ottimale di 41,5°C (Levin, 2007). Levin (2007) ha suggerito che questi organismi dovrebbero essere definiti "termotolleranti" poiché non mostrano una vera termofilia (crescita a 55°C o superiore). Tuttavia, uno studio di De Cesare et al. (2003) ha rilevato che *C. jejuni* sopravvive per più di 4 ore a 27°C e con il 60-62% di umidità relativa su alcune comuni superfici a contatto con gli alimenti. Queste caratteristiche di crescita riducono la capacità dei *Campylobacter* di moltiplicarsi al di fuori di un animale ospite e negli alimenti durante la loro lavorazione e conservazione (Park, 2002). La crescita non avviene in ambienti con  $a_w$  inferiore a 0,987, mentre la crescita ottimale avviene a valori di  $a_w$  pari a 0,997.

Il congelamento-scongelo riduce la popolazione di *Campylobacter* spp. (Stern e Kazmi, 1989). Nelle colture pure, *Campylobacter* spp. sono normalmente inattivati dal congelamento a -15°C in appena 3 giorni (Stern e Kotula, 1982); tuttavia, il congelamento non elimina il patogeno dagli alimenti contaminati (Lee et al., 1998).

*Campylobacter* spp. non sopravvive al di sotto di pH 4,9 e al di sopra di pH 9,0 e crescere in modo ottimale a pH variabile tra 6,5-7,5.

Questi batteri non sporigeni sono essenzialmente microaerofili e per la crescita richiedono un'atmosfera con bassa tensione di ossigeno (3-6%), mentre la loro moltiplicazione è inibita in un'atmosfera al 21% di ossigeno e ad un'elevata percentuale di anidride carbonica (dal 5 al 10 %) (Garénaux et al., 2008).

Il cloruro di sodio (NaCl) è uno dei conservanti più utilizzati nell'industria alimentare. I *Campylobacter* hanno scarsa tolleranza al cloruro di sodio, ed in particolare *C. jejuni* è altamente sensibile all'elevata osmolarità rispetto alla maggior parte degli altri batteri enterici (Feng et al., 2018; Kovacs et al., 2019). *C. jejuni* non è in grado di moltiplicarsi in presenza di concentrazioni di NaCl  $\geq$  2% e a 42°C, ma può moltiplicarsi a concentrazioni dallo 0,5% all'1,5% di NaCl a 42°C (Gomes et al., 2018). Lake et al. (2019) hanno riferito che *C. jejuni* potrebbe tollerare il 7,5% di NaCl nei terreni di coltura a 4°C meglio che a 22–30°C, misurato mediante bioluminescenza. Da analisi condotte da Zhao et al. (2019) è emerso che *C. jejuni* può aumentare l'espressione dei geni dello stress ossidativo e dei geni dello shock termico dopo l'esposizione a condizioni iperosmotiche.

Tabella 4. Limiti per la crescita di *Campylobacter* termotolleranti

	MINIMO	OPTIMUM	MASSIMO
T° C	30-32	42 - 43	45
pH	4,9	6,5 – 7,5	ca. 9
NaCl (%)	-	0,5	1,5
a <sub>w</sub>	> 0.987	0,997	-
atmosfera		5% O <sub>2</sub> 10% CO <sub>2</sub>	

Un importante aspetto nell'epidemiologia della *Campylobacter* campilobatteriosi è la sopravvivenza di *Campylobacter* nel cosiddetto "stato vitale non coltivabile" ("Viable but non-culturable", VBNC).

Alcuni batteri possono sopportare ambienti sfavorevoli, come la privazione dei nutrienti, l'essiccazione, il pH inadeguato e le variazioni di temperatura (Blanco-Lizarazo et al., 2018; Jin e Riedel–Kruse, 2018). Pochi batteri sono in grado di vivere in questi ambienti sfavorevoli, ma

alcuni organismi possono entrare in uno stato VBNC che ne favorisce la sussistenza. I batteri nello stato VBNC non sono in grado di moltiplicarsi e la loro morfologia si trasforma, assumendo forma coccoide (Poursina et al., 2018; Jin e Riedel-Kruse, 2018). Nello stato VBNC i batteri riducono il loro metabolismo ma possono mantenere la virulenza e, una volta ingeriti dall'ospite, causare infezione e malattia. Lo stato VBNC è stato osservato in diversi microrganismi, come *C. jejuni*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Salmonella Typhi* ed *Helicobacter pylori* (Kim et al.,2021).

In un ambiente sfavorevole, *C. jejuni* può sopravvivere nello stato VBNC. *C. jejuni* entra in uno stato VBNC quando coltivato per 18-28 giorni a 4°C. La forma VBNC di *C. jejuni* influenza l'espressione di CadF (*Campylobacter* adhesion antigen to fibronectin) a 4°C, proteina che influenza l'invasione microbica. La forma VBNC di *Campylobacter* è stata classificata in base al metabolismo ridotto, all'aumento della produzione di enzimi e substrati degradanti. Di conseguenza, i microrganismi possono vivere per periodi più lunghi in condizioni ostili (Kim et al.,2021).

La capacità di alcuni ceppi di entrare in questo stato di dormienza potrebbe spiegare il motivo per cui alcuni genotipi sono più persistenti in alcune nicchie e fonti ambientali (Bronowski et al., 2014). Dopo un periodo di riattivazione, viene ripristinata la coltivabilità e quindi anche l'infettività. L'importanza di questo stato risiede nel suo ruolo di possibile serbatoio di infezione e conseguente implicazioni per la salute pubblica (Lourdes et al., 2018).

### 3. Il ruolo del pollo nell'epidemiologia della campilobatteriosi

Nella Campilobatteriosi è molto importante il ruolo dei serbatoi animali. *Campylobacter* spp. è un batterio commensale del tratto gastrointestinale di molti animali selvatici (anatre e gabbiani), animali da allevamento (bovini, piccoli ruminanti e maiali) e animali da compagnia (cani e gatti). I serbatoi più importanti sono rappresentati dalle specie aviarie adatte al consumo umano (Damborg et al., 2004; Thakur e Gebreyes, 2005).

I *Campylobacter* sono microrganismi responsabili di zoonosi e la trasmissione avviene per via oro-fecale attraverso l'ingestione di cibo e acqua contaminati (Facciola et al., 2017). La principale nicchia ambientale è rappresentata dal tratto intestinale di tutte le specie aviarie, in particolare del pollame (es. polli da carne, galline ovaiole, tacchini e anatre) che è considerato il principale veicolo di trasmissione. Il consumo della carne dei colatili, in particolare quella di pollo, infatti, è responsabile di circa il 50-70% dei casi umani di campilobatteriosi. Tuttavia, anche il consumo di latte crudo, carne rossa cruda, frutta e verdura è stato identificato come possibile causa di trasmissione. Moore et al. (2005) hanno indicato che la prevalenza della colonizzazione da *Campylobacter* spp. nei bovini varia ampiamente, anche tra lo 0-80%, mentre si attesta intorno al 20% negli ovini (Facciola et al., 2017). L'infezione è causata dalle due specie di *Campylobacter* termotolleranti prevalenti: *C. jejuni* e *C. coli*.

#### 3.1 Specie e serbatoi animali

I *Campylobacter* termotolleranti sono comunemente rinvenuti come commensali del tratto gastrointestinale di specie selvatiche, quali anatre e gabbiani; di specie di allevamento, quali bovini, piccoli ruminanti e suini; di specie da compagnia, quali cani e gatti; e in tutte le specie avicole da consumo (Danborg et al., 2004; Bae et al., 2005; Thakur e Gebreyes, 2005; Acik et al., 2006; EFSA, 2011).

Negli avicoli, e specialmente nel broiler, la colonizzazione avviene in maniera imponente a livello ciecale ed essa è localizzata a livello della mucosa intestinale, al di sopra delle cripte dei villi (Beery et al., 1988, Byrne et al., 2007).

Tale evidenza è supportata anche dal fatto che, nelle analisi di laboratorio, il batterio è maggiormente isolato da campioni ciecali piuttosto che da tamponi cloacali con conseguente variazione dei risultati di prevalenza in base al campione utilizzato (Bardon et al., 2008).

Studi recenti hanno dimostrato che i broiler infetti da *C. jejuni* non hanno funzione di semplice serbatoio, ma producono feci più liquide, per cui la lettiera risulta più bagnata e le lesioni podali più frequenti. È stata rilevata la presenza di danni alle cellule dell'epitelio intestinale, ai villi e alle cripte che comporta un calo della crescita e una maggiore secrezione di fluidi. Anche se non si verifica un'enterite conclamata, al macello si possono osservare lesioni podali (Humphrey et al., 2014).

I segni clinici o patologici in animali risultati positivi all'isolamento del batterio sono comunque limitati, confermando in questo animale il ruolo principale di commensale di tale microrganismo (Dhillon et al., 2006). Infatti, l'alta temperatura metabolica del pollo, e in generale degli avicoli di allevamento, predispone queste specie ad essere ospiti ottimali per i *Campylobacter* termotolleranti (Horrocks et al., 2009).

Nel broiler *Campylobacter* è frequentemente presente come commensale del tratto gastrointestinale e nella maggior parte dei casi non provoca manifestazioni cliniche. Il punto di entrata del batterio in allevamento è ancora molto discusso, ma le principali fonti di infezione sono: l'ambiente di allevamento, i mangimi, il personale che funge da veicolo per l'agente patogeno, gli uccelli selvatici, gli animali domestici presenti in allevamento (quali cani) e anche gli insetti, come le mosche (Shane et al., 1985; Newell e Fernely, 2003; Bates et al., 2004; Hald et al., 2004). A conferma di quest'ultimo mezzo di trasmissione, alcuni studi hanno dimostrato che la prevalenza stagionale delle mosche può essere associata ad un aumentato rischio di contrarre l'infezione da parte dei broiler in questo periodo dell'anno. Inoltre, il controllo ambientale delle mosche, tramite l'utilizzo di reti anti-insetto nel sistema di ventilazione dell'allevamento, ha evidenziato un ritardo ed una diminuzione della colonizzazione degli avicoli da parte di *Campylobacter* (Hald et al., 2007).

Quando un soggetto diviene positivo all'infezione, si arriva rapidamente a concentrazioni intestinali superiori a  $10^9$  CFU/g; di conseguenza, l'elevata carica batterica eliminata con le feci e la coprofagia da parte dei soggetti sani diviene un mezzo per una rapida diffusione del batterio nell'allevamento. La trasmissione è quindi di tipo orizzontale, tra soggetto infetto e soggetto sano (Humphrey et al., 2014).

Il ruolo della trasmissione verticale è ancora controverso, poiché il batterio è stato rinvenuto a bassi livelli nel seme (Buhr et al., 2005) e nei follicoli ovarici (Cox et al., 2005). Non ci sono tuttavia evidenze dirette che *Campylobacter* derivato dai riproduttori sia una rilevante e

significativa fonte di infezione per la progenie. Nonostante infezioni sperimentali nel broiler abbiano dimostrato che l'animale può contrarre l'infezione da *Campylobacter* già al primo giorno di vita, in allevamenti commerciali la presenza del microrganismo nei campioni fecali viene rilevata non prima delle due o tre settimane di vita dell'animale (Stern et al., 2001). La ragione di questa cosiddetta fase di latenza è tuttora sconosciuta, ma potrebbe essere dovuta all'effetto protettivo degli anticorpi di origine materna (Sahin et al., 2003) oppure a differenze nella flora microbica dell'ospite dovute all'età dell'animale stesso. In quest'ultima ipotesi, la flora microbica residente nell'apparato gastro-enterico del pollo svolgerebbe un ruolo competitivo nei confronti di *Campylobacter*, ritardandone la colonizzazione (Van der Wielen et al., 2000). La comprensione delle ragioni di questa fase di latenza potrebbe essere la chiave per lo sviluppo di nuove misure di controllo della prevalenza del batterio in allevamento.

Oltre al consumo di alimenti contaminati, un'ulteriore possibile fonte di contagio da parte dell'uomo è rappresentata da animali che fungono da reservoir (Blaser et al., 1984). Numerosi animali domestici sono stati identificati come ospiti di *Campylobacter spp.* Molti autori hanno riportato l'isolamento di *C. jejuni*, *C. coli*, *C. upsaliensis*, *C. helveticus* e *C. lari* da campioni fecali di cani (Tsai et al., 2007; Koene et al., 2004). Chaban et al. (2010) hanno riportato l'isolamento di *C. jejuni* in 5 campioni feci di cane su 70 esaminati (7%) a concentrazioni fino a  $10^6$  CFU/g. Poiché la dose infettante minima di *C. jejuni* è pari a 500 microrganismi, queste alte concentrazioni presenti nelle feci rappresentano un possibile fattore di rischio per la contaminazione ambientale e l'infezione umana da esposizione accidentale. I veterinari presumono che la contaminazione animale possa verificarsi a seguito dell'ingestione di carne cruda (Facciola et al., 2017).

Le modalità di trasmissione di *Campylobacter* dagli animali all'uomo non sono ancora state descritte; tuttavia, accarezzare gli animali e manipolare gli oggetti entrati in contatto con loro potrebbe trasferire agenti patogeni dalla pelliccia o dall'oggetto contaminato alle mani umane e portare all'infezione (Facciola et al., 2017).

È stato dimostrato che anche le mosche rappresentano un importante vettore per *Campylobacter* e sono, quindi, in grado di contaminare sia l'uomo che gli animali. Gordon et al. (2005) hanno dimostrato che alcuni casi di diarrea sono aumentati soprattutto durante la stagione estiva quando le larve crescono e maturano aumentando il numero di insetti adulti. Layton et al. (2005) e Neal et al. (1997) hanno riportato la riduzione dei casi di sindromi

diarroiche a seguito dell'applicazione di misure per il controllo delle mosche. Hanno ipotizzato che la trasmissione della malattia avvenga per contatto diretto degli alimenti con le zampe, la proboscide e il pelo del corpo degli insetti che sono stati contaminati con materiale fecale o rigurgitato contaminato (Gordon, 2005). La contaminazione da parte degli insetti può verificarsi in qualsiasi fase della catena alimentare (Facciola et al., 2017).

### 3.2 Trasporto dei volatili al macello

In generale il trasporto degli animali dall'allevamento al macello rappresenta una fase critica da monitorare in quanto il carico, il viaggio e lo scarico sono eventi stressanti, che, anche se con certa variabilità di specie, possono accentuare da un lato problematiche già presenti in allevamento e dall'altro influenzare il livello di contaminazione delle carcasse, nonché la qualità delle carni. È quindi fondamentale verificare le condizioni del trasporto di volatili destinati alla macellazione.

Il trasporto all'interno del territorio nazionale e comunitario degli animali deve avvenire nel rispetto del benessere animale ai sensi del Regolamento (CE) n.1/2005 del Consiglio del 22 dicembre 2004 sulla protezione degli animali durante il trasporto e le operazioni correlate.

Per quanto riguarda i mezzi di trasporto, questi devono essere in perfette condizioni tecniche, conformi a quanto previsto dal Regolamento (CE) n.1/2005. I mezzi di trasporto/moduli devono essere facilmente lavabili e disinfettabili. La ventilazione e la quantità d'aria circolante devono essere adeguate alle condizioni del trasporto e al tipo di animali trasportati. Il pollame può essere caricato solo sui mezzi di trasporto che sono stati accuratamente puliti e disinfettati. Tali operazioni devono essere effettuate dopo ogni trasporto di pollame e prima di ogni nuovo carico. Inoltre, devono essere eseguite su tutti gli elementi del mezzo di trasporto, nonché su tutte le attrezzature presenti nel veicolo. In particolare, sarebbe opportuno sanificare gli automezzi all'ingresso e all'uscita dagli allevamenti, mentre il lavaggio e la disinfezione devono sempre essere eseguite su mezzi di trasporto per pollame prima che il mezzo vuoto lasci il macello.

Nei piani deve essere garantito uno spazio sufficiente affinché il pollame riesca a posizionarsi adeguatamente durante il viaggio in posizione corrispondente al proprio comportamento etologico e comunque in grado di assicurare una ventilazione adeguata. È importante evitare ammassamenti che possono provocare soffocamento degli animali durante il trasporto. I

contenitori, oltre a rispettare tutte le norme e le condizioni previste per la protezione e il benessere animale, devono possedere caratteristiche affinché siano facilmente pulibili e sanificabili, per limitare ai minimi livelli qualunque rischio di contaminazione crociata.

Al fine di ridurre lo stress degli animali, nella fase di carico è opportuno ridurre al minimo la luce all'interno dei capannoni, posizionando teli oscuranti alle finestre, sulle porte di accesso ai capannoni e sulle prese dei ventilatori. È opportuno inoltre sospendere l'alimentazione degli animali circa 4/6 ore dall'inizio delle operazioni di carico e comunque il periodo di digiuno degli animali non deve superare le 12 ore. Le linee di abbeverata, invece, devono sempre essere lasciate a disposizione degli animali fino al momento del carico.

È stato dimostrato in diversi studi che il reale problema durante il trasporto è rappresentato proprio dalle gabbie di trasporto; queste infatti sono una potenziale fonte di infezione da *Campylobacter* per i broiler. Inoltre le procedure di lavaggio standard delle gabbie hanno dimostrato di essere in gran parte inefficaci nel rimuovere *Campylobacter* (Slader et al 2002; Ramabu et al 2004), in parte anche a causa delle difficoltà nel pulire le superfici in plastica (Allen et al 2008).

È quindi fondamentale che ulteriori procedure di disinfezione vengano applicate per migliorare la biosicurezza dei veicoli e delle attrezzature (in particolar modo delle cassette per il trasporto al macello) per ridurre al minimo la contaminazione ambientale e l'arrivo al macello di animali che eliminano cariche elevate di *Campylobacter*.

### 3.3 Macellazione: fasi a rischio

Secondo diversi studi il livello di contaminazione da *Campylobacter* delle carcasse è strettamente influenzato sia dalla carica microbica presente sui polli in entrata (sia a livello intestinale che superficiale, quindi cute, piume e zampe), ma soprattutto dalle varie fasi che caratterizzano il processo di macellazione, a partire dall'arrivo fino alla refrigerazione delle carcasse (Seliwiorstow et al., 2016).

Come detto precedentemente, i volatili vengono trasferiti dall'allevamento allo stabilimento di macellazione mediante automezzi autorizzati (camion, camion e rimorchio) in gabbie modulari studiate per ridurre le operazioni che prevedono l'intervento di manodopera, per limitare i danni da carico e scarico, per evitare che le deiezioni imbrattino i volatili che si trovano nelle gabbie

sottostanti e infine per facilitare le operazioni di pulizia, lavaggio e disinfezione. Lo scarico delle gabbie nello stabilimento di macellazione deve avvenire al più presto dopo il loro arrivo ed in un'area apposita, denominata area di sosta. Quest'ultima deve essere coperta, sufficientemente illuminata ma non troppo, con pavimento lavabile e disinfettabile, e deve essere adiacente al macello. I lotti di animali vengono separati in base alla loro provenienza in zone diverse dell'area di sosta; in questo modo è possibile identificare in ogni momento i diversi lotti, prima della macellazione. Nell'area di sosta vanno create le condizioni più adeguate al fine di limitare mortalità, stress e calo peso. Nella stagione fredda lo spazio tra le gabbie modulari nell'area di sosta può essere ridotto, mentre nella stagione estiva vi è la necessità di una maggiore circolazione d'aria tra le gabbie stesse. Il Veterinario Ufficiale deve controllare la documentazione di scorta (Modella 4, certificato sanitario) e deve provvedere al controllo dei danni da carico e trasporto ed alla verifica dello stato sanitario dei volatili, osservando attentamente gli animali nelle gabbie prima della macellazione (Seliwiorstow et al., 2016).

Durante la macellazione, i principali punti critici per la contaminazione delle carcasse sono stati identificati nella spiumatura, nell'eviscerazione e nel lavaggio finale delle stesse, con variazioni altalenanti sulla prevalenza di *Campylobacter*. I polli vivi, appartenenti ad uno stesso gruppo, vengono sospesi e agganciati manualmente per le zampe (metatarso) ai ganci della catena di macellazione, in un locale scarsamente illuminato, evitando fenomeni eccitativi, sofferenze e contusioni. I polli appesi a testa in giù vengono avviati allo stordimento che deve determinare uno stato d'incoscienza del soggetto, così come previsto dal Regolamento CE 1099/2009. Lo stordimento si realizza attraverso l'uso di uno "storditore elettrico" (a bagno d'acqua elettrificato) che garantisce il passaggio di corrente dalla testa alle zampe, fino ai ganci della catena di macellazione. Il voltaggio e l'amperaggio di quest'apparecchio sono in relazione alla specie del volatile macellato.

Il Regolamento CE 1099/2009, relativo alla protezione degli animali durante l'abbattimento, nel capo II dell'allegato I (elenco dei metodi di stordimento e relative caratteristiche) descrive le prescrizioni specifiche relative ad alcuni metodi di stordimento. Per quanto riguarda i bagni d'acqua per lo stordimento elettrico dei volatili da cortile si riporta che per gli animali di cui alla tabella 4 lo stordimento per mezzo di bagni d'acqua è effettuato applicando una corrente dell'intensità minima indicata nella stessa e gli animali devono essere esposti alla corrente per almeno quattro secondi.

Tabella 5. Requisiti elettrici per dispositivi di stordimento con bagni d'acqua (valori medi per animale). (Allegato I, Regolamento CE 1099/2009)

Frequenza (Hz)	Polli	Tacchini	Anatre e oche	Quaglie
< 200 Hz	100 mA	250 mA	130 mA	45 mA
da 200 a 400 Hz	150 mA	400 mA	Non consentito	Non consentito
da 400 a 1 500 Hz	200 mA	400 mA	Non consentito	Non consentito

Allo stordimento segue la morte dell'animale, realizzata mediante iugulazione esterna che comporta la recisione dei grossi vasi del collo in corrispondenza della regione della gola. Il volatile, dopo il dissanguamento, viene trasferito nella vasca di scottatura con acqua calda alla temperatura di circa 51-52°C. La corretta e costante temperatura dell'acqua ha la funzione di dilatare i follicoli delle penne e quindi di agevolare l'operazione di spiumatura, che deve essere immediata e completa. La temperatura delle vasche di scottatura deve essere continuamente monitorata e non deve superare valori di 54° C in quanto a questa temperatura si ha la formazione di lesioni sulla cute dell'animale per perdita dello strato superficiale dell'epidermide e comparsa di fluido sieroso.

Alla temperatura di 50°-52°C si ha inattivazione solo di microrganismi psicrofili e psicrotrofi, e non della maggior parte dei microrganismi introdotti dai volatili vivi, che sono mesofili e trovano condizioni estremamente favorevoli alla loro sopravvivenza, non solo per l'azione protettiva del materiale organico che viene ad accumularsi, quanto piuttosto per quella del pH, che si mantiene a valori di 6-7. Particolarmente grave, in questa fase, è la sopravvivenza dei batteri patogeni, sia perché da pochi animali infetti possono essere trasferiti a moltissimi altri (c.d. "contaminazione crociata"), sia perché, nella successiva fase di spiumatura, oltre a contaminare impianti, possono penetrare nei follicoli rimasti beanti o in altre piccole soluzioni di continuo della cute (Seliwiorstow et al.,2015).

Segue poi l'operazione di spiumatura, che viene eseguita da macchine poste in serie che agiscono tramite particolari dita di gomma che asportano le penne dal corpo del volatile. Sulle macchine spiumatrici si trovano docce d'acqua tiepida che garantiscono la pulizia della carcassa dalle penne e la riduzione, per quanto possibile, della carica microbica. Il piumaggio sporco o imbrattato di feci condiziona in maniera significativa l'igiene di questa fase con esiti importanti per quanto riguarda la conservabilità e la possibile presenza di *Campylobacter* sulla superficie

della carcassa. La spiumatura è un'operazione che comporta forse i rischi maggiori di contaminazione crociata in tutta la catena di macellazione. È stato, infatti, dimostrato che un solo volatile contaminato può provocare la contaminazione di più di duecento volatili che vengono spiumati in seguito (Seliwiorstow et al., 2015).

Nonostante in questa fase vengano adottati normalmente dei sistemi di doccia continua con acqua potabile, la velocità di progressione della catena e quella di rotazione delle dita di gomma sono tali che non si può pensare che la carica microbica superficiale possa essere ridotta. Molto spesso, invece, avviene proprio il contrario. Infatti, per effetto della compressione esercitata dalle dita di gomma, si può verificare una fuoriuscita di materiale fecale, che contamina rapidamente i volatili successivi. È inoltre da considerare che l'atmosfera caldo-umida che si crea all'interno delle spennatrici può favorire la moltiplicazione di alcuni microrganismi già durante la lavorazione, soprattutto se negli impianti esistono anfrattuosità nelle quali possano annidarsi residui di penne. Infine, la particolare conformazione delle dita di gomma ne rende estremamente difficile la pulizia e la disinfezione alla fine della giornata lavorativa, cosicché può venire a costituirsi un vero e proprio serbatoio di contaminazione.

All'operazione di spiumatura segue l'eviscerazione. Tale operazione per molto tempo è stata considerata una delle più critiche dal punto di vista igienico, sia che l'asportazione dei visceri fosse effettuata manualmente, che con evisceratrici meccaniche, perché la rottura dell'intestino si verificava con una certa frequenza. Attualmente l'eviscerazione manuale, negli impianti di una certa dimensione, è stata abbandonata; le evisceratrici meccaniche sono state notevolmente migliorate (con il pacchetto dei visceri addominali vengono asportati anche i polmoni) e, sempre che la taglia degli animali in catena sia sufficientemente uniforme, la rottura dell'intestino costituisce un evento eccezionale. Nonostante ciò, diversi studi riportano un notevole aumento della concentrazione di *Campylobacter* sulle carcasse testate dopo tale fase. Gruntal et al. nel loro studio hanno evidenziato concentrazioni di *Campylobacter* più elevate subito dopo l'eviscerazione, rispettivamente del 19% e del 223% delle CFU rispetto alle concentrazioni misurate in seguito alla fase di spiumatura (Gruntar et al., 2005). In ogni caso un buon lavaggio alla fine della lavorazione è in grado di ridurre la contaminazione delle carcasse di un logaritmo. Affinché tale condizione si mantenga, devono essere ridotti al minimo i contatti manuali o con superfici (tavoli, nastri trasportatori, tramogge, etc.) sia prima, sia dopo la refrigerazione, fino al confezionamento.

Per quanto riguarda le carcasse parzialmente eviscerate, cosiddette “sfilate”, verificandosi normalmente un imbrattamento della cavità addominale da parte di materiale fecale, che non è rimosso, vengono inevitabilmente a ritrovarsi in questa sede livelli più elevati di contaminazione. L’eviscerazione deve essere praticata da personale bene addestrato che rispetti, nell’esecuzione del lavoro, alcune fondamentali norme d’ordine tecnico ed igienico. I volatili macellati devono comunque essere aperti in modo tale che le cavità e tutti i visceri pertinenti possono essere ispezionati. Nella preparazione industriale delle carcasse "a busto", i visceri estroflessi dalle evisceratrici, una volta superata favorevolmente l'ispezione *post-mortem*, vengono rimossi dalle carcasse e avviati, mediante nastri trasportatori o docce aperte a scorrimento d'acqua continuo, ad apposite linee di lavorazione. I colli vengono generalmente separati dalle carcasse prima dell'eviscerazione (Seliwiorstow et al., 2016).

Numerose sono in letteratura le segnalazioni dell’aumento della contaminazione di *C. jejuni* nelle carcasse di diverse specie di volatili esaminati subito dopo l'eviscerazione (Seliwiorstow et al., 2016; Seliwiorstow et al., 2015.; Gruntar et al.2015). Dato che alcuni macelli sono in grado di controllare meglio la contaminazione da *Campylobacter* rispetto ad altri, ciò significa che sono possibili miglioramenti del processo di macellazione, senza far ricorso alla decontaminazione chimica o fisica (Seliwiorstow et al., 2016). Il Regolamento CE n. 853/2004 consentirebbe trattamenti di decontaminazione nel caso una sostanza si dimostrasse sicura ed efficace. Tuttavia, nessuna sostanza chimica per i trattamenti di decontaminazione delle carcasse di volatili da cortile è attualmente autorizzata nella UE, a differenza di ciò che avviene in altri paesi nel mondo.

Dopo la visita ispettiva *post-mortem* le carcasse devono essere sottoposte ad opportuna refrigerazione. Se necessario, nei casi previsti da regolamenti comunitari, disposizioni nazionali, o dall’Autorità Competente, si effettuano esami di laboratorio, volti ad escludere l’eventuale presenza sulla cute, nel muscolo o negli organi commestibili di residui di farmaci o di sostanze non autorizzate, ma utilizzate in alcune fasi della lavorazione (es. disinfettanti), o di microrganismi patogeni o potenzialmente patogeni (Regolamento di esecuzione (UE) 2019/627).

### 3.4 Alimenti a rischio e cross contaminazione

La campilobatteriosi è una malattia la cui trasmissione all’uomo avviene prevalentemente per via alimentare. La reale capacità infettante di *Campylobacter* è dimostrabile per cibi fortemente

contaminati, considerando che la dose minima in grado di produrre l'infezione è di circa 500 microrganismi (Kothary e Babu, 2001).

Le infezioni sono causate solo dai *Campylobacter* che sopravvivono negli alimenti, perché non hanno la capacità di moltiplicarsi nelle condizioni in cui si trovano al di fuori dell'ospite (Colavita et.al 2012).

L'uomo può infettarsi principalmente attraverso quattro vie: tramite alimenti contaminati consumati crudi o poco cotti; tramite alimenti cotti e contaminati successivamente (cross-contaminazione); per contatto diretto con animali o più raramente con persone infette; e a causa di contaminazione ambientale (Fig. 3) (EFSA e ECDC, 2021; Young et al., 2007).

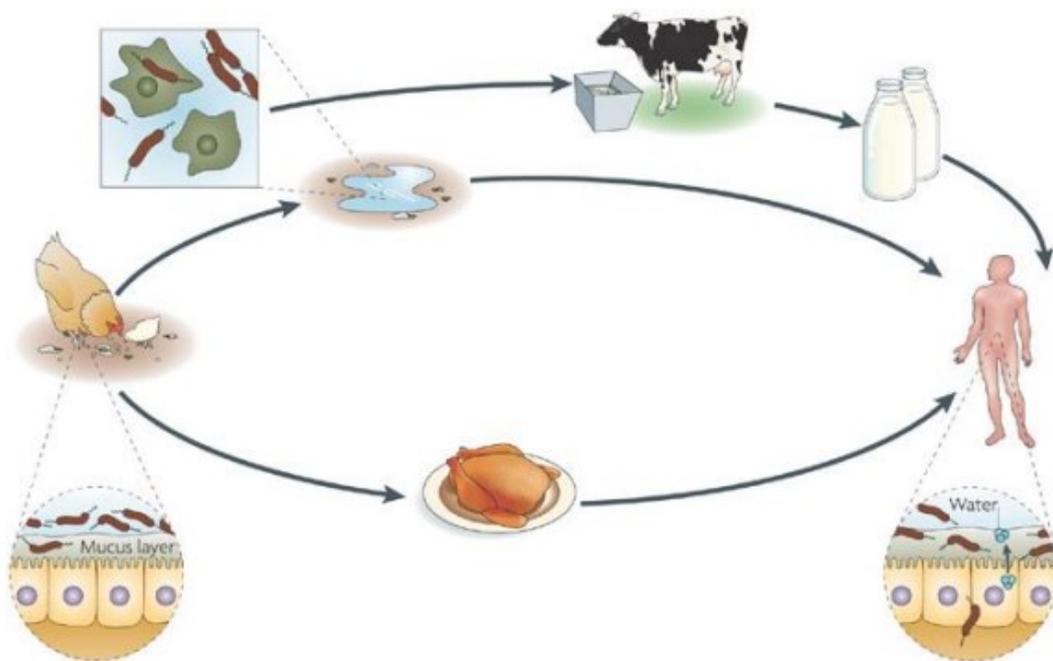


Figura 3. Le fonti e gli esiti dell'infezione da *Campylobacter jejuni* (Young et al.,2007)

Le principali fonti d'infezione riguardano alimenti di origine animale non correttamente manipolati o poco cotti, prevalentemente carni avicole (EFSA e ECDC, 2021), ma anche latte crudo, carne di bovino e suino poco cotta, molluschi e acqua non trattata (Man, 2011).

Le acque contaminate, non trattate o insufficientemente trattate con cloro, rivestono un ruolo significativo nell'epidemiologia della campilobatteriosi (Jakopanec et al. 2008). *C. jejuni* è stato, infatti, isolato da acque superficiali, fiumi, laghi e torrenti soprattutto nei mesi freddi invernali (Colavita et al., 2012). La contaminazione delle acque è influenzata notevolmente anche dalla

presenza di liquami provenienti da allevamenti e feci di animali selvatici o di uccelli che hanno accesso a fonti di acqua non protette (MacDonald et al., 2015).

*C. jejuni* sopravvive nell'acqua fino a quattro settimane alla temperatura di 4° C, mentre persiste solo per quattro giorni tra 14°C a 25°C. Nell'acqua *Campylobacter* si può trasformare in uno stato "vitale non coltivabile", per il quale la virulenza viene riacquisita in un ospite animale (Colavita et al., 2012).

Il latte crudo è spesso identificato come veicolo di infezione da *Campylobacter*. Può essere contaminato da materiale fecale durante la mungitura o a seguito di mastiti subcliniche dell'animale. In ogni caso, un'adeguata pasteurizzazione ( $\geq 72^{\circ}\text{C}$  per 15 secondi) inattiva completamente i *Campylobacter* enterici (Heuvelink et al., 2009).

Nei prodotti ittici, in particolar modo nei molluschi, la contaminazione è il risultato della presenza di *Campylobacter* nelle acque di allevamento e di stabulazione. Ad esempio, è presumibile che i molluschi vengano contaminati da *C. lari* ad opera delle feci di gabbiani che si nutrono nelle acque in cui crescono (Facciola et al., 2017).

La presenza di *Campylobacter* termotolleranti è stata descritta anche in prodotti carnei, in particolare visceri o organi edibili quali cuore, polmoni, fegato, intestini, nonché da carcasse di suini, bovini e ovini appena macellati. I trattamenti (salagione, ecc.), che subiscono gli intestini prima del loro impiego nelle industrie di trasformazione, non inattivano completamente il microorganismo. La presenza nelle carni è, in genere, da considerare come la conseguenza dell'imbrattamento superficiale con materiale fecale, durante le operazioni di macellazione. (Colavita et. al., 2012)

Il consumo di carne di pollame, se non cruda, comunque poco cotta rappresenta la principale fonte potenziale di campilobatteriosi per l'uomo. L'inquinamento delle carni è di origine fecale grazie alla diffusione di *Campylobacter* su carni e frattaglie durante le operazioni di macellazione *Campylobacter*. Come ricordato in precedenza, le fasi della macellazione del pollame che risultano più a rischio sono la spiumatura e l'eviscerazione meccanica: l'immersione nelle vasche di acqua calda precedentemente alla spiumatura o una rottura accidentale del pacchetto intestinale sono causa di contaminazione della carcassa. La contaminazione interessa soprattutto la cute, dove *Campylobacter* è in grado di rimanere vitale per lunghi periodi a temperatura di refrigerazione o di congelamento, grazie all'elevata umidità e alla persistenza di acqua nei

follicoli delle penne. La resistenza nelle carni di pollame si riduce drasticamente se queste sono mantenute a temperature superiori a quelle di refrigerazione (Colavita et al.2012).

Tuttavia, il consumo di pollo congelato all'atto dell'acquisto è stato associato ad un rischio di infezione basso. Il congelamento, infatti, riduce la carica di *Campylobacter*. Studi hanno dimostrato che è possibile ottenere una riduzione di 1 log<sub>10</sub> ufc/g dopo 1 giorno di conservazione a una temperatura di congelamento di -22 °C. (Sampers et al.,2010).

Al contrario il consumo di pollo cotto al barbecue risulta essere maggiormente implicato nella diffusione di *Campylobacter*. Una cottura inadeguata del pollame può aumentare il rischio di infezioni come osservato nello studio di Istre et al. (1984), dove la malattia era associata al consumo di carne di pollo alla brace poco cotta, mentre raggiungere una temperatura interna superiore a 70 °C è sufficiente per l'inattivazione del microorganismo.

I risultati dello studio di MacDonald e collaboratori (2015) suggeriscono che dovrebbero essere rafforzate anche le linee guida per la preparazione sicura del pollame a livello domestico. Il fatto che la malattia tra i consumatori di pollo fosse più frequentemente associata alla preparazione del cibo sui barbecue e tra le persone che mangiano carne poco cotta rafforza il fatto che garantire una corretta manipolazione e trattamento termico del pollo crudo continua a rappresentare una sfida. Ciò può essere dovuto non solo all'esposizione attraverso il consumo di carne poco cotta, ma soprattutto alla contaminazione crociata di altri alimenti e utensili durante la preparazione. Il lavaggio frequente delle mani dopo il contatto con la carne cruda è associato a un ridotto rischio di infezione, e questa è una pratica igienica che dovrebbe essere ripetutamente promossa dalle autorità per la sicurezza alimentare e la salute pubblica (Domingues et al.,2012; MacDonald et al.,2015).

Un aspetto importante del rischio di infezione legato al consumo di carne di pollo è quello della cross-contaminazione, spesso responsabile della contaminazione batterica degli alimenti. La cross-contaminazione si realizza per inosservanza di basilari norme igieniche nella preparazione degli alimenti, sia tramite indumenti o mani contaminate, sia tramite strumenti o utensili che trasferiscono *Campylobacter* da un alimento ad un altro. In questo caso quindi i responsabili della trasmissione di *Campylobacter* al consumatore non saranno direttamente la carne di pollo, che funge solo da veicolo dei batteri, ma gli alimenti che verranno consumati crudi, come i vegetali, a cui indirettamente è stato trasferito il patogeno. La cross-contaminazione è particolarmente insidiosa quando riguarda «alimenti crudi – alimenti cotti», nei quali i batteri

non trovano antagonisti (distrutti dal trattamento termico) e possono moltiplicarsi più facilmente (MacDonald et al.,2015).

Nel report dell'EFSA e dell'ECDC sui risultati delle attività di monitoraggio delle zoonosi svolte in 36 paesi europei, pubblicato nel 2021, e relativo ai dati raccolti nella UE tra il 2015 e il 2019, è emerso che le unità campionarie di carne fresca di polli da carne e tacchini positive per *Campylobacter* erano pari al 32,10% e 33,04%, rispettivamente. Questi dati attestano in maniera evidente che la diffusione del patogeno nella carne fresca delle due specie avicole sia molto elevata.

## 4. La campilobatteriosi nell'Unione europea

Il report dell'EFSA dell'ECDC pubblicato nel 2021 mostra i risultati delle attività di monitoraggio sulle zoonosi in 36 paesi Europei (28 stati membri (MS) e 8 stati non membri (non-MS)). La prima e la seconda zoonosi più segnalate nell'uomo sono rispettivamente la campilobatteriosi e la salmonellosi. Il trend nell'UE dei casi confermati di queste due malattie è stato stabile dal 2015 al 2019 (EFSA e ECDC, 2021).

La campilobatteriosi è inserita nella lista A delle malattie zoonosiche in base alla Direttiva CE 99/2003, e come tale è soggetta a monitoraggio annuale in tutti i paesi membri.

Nella figura sottostante (Fig. 4) è rappresentato il numero dei casi confermati delle 13 zoonosi più diffuse nei paesi europei e segnalate report di EFSA ed ECDC (2021).

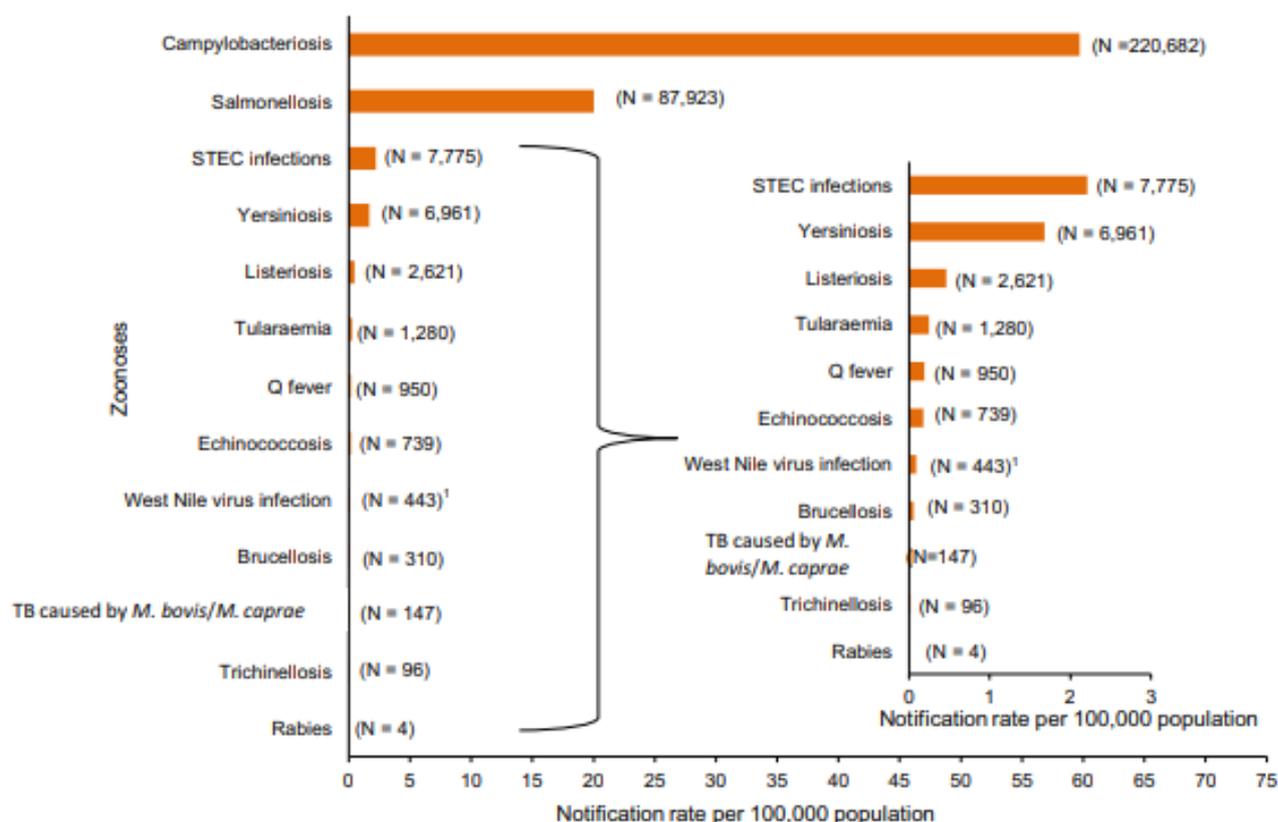


Figura 3. Numeri e tassi di notifica confermati di zoonosi nell'EU, 2019 (EFSA e ECDC, 2021).

La campilobatteriosi è la zoonosi più comunemente segnalata nell'uomo nella UE fin dal 2005 e rappresenta attualmente il 50% di tutti i casi di zoonosi notificati. Nel 2019 il numero di casi confermati di campilobatteriosi umana nella UE era pari a 220.682, corrispondente ad un tasso

di notifica di 59,7 casi per 100.000 abitanti. I dati segnalano, pertanto, una diminuzione del 6,9% rispetto al tasso del 2018 (64,1 casi ogni 100.000 abitanti) (EFSA e ECDC, 2021).

Per quanto riguarda i focolai di malattia a trasmissione alimentare, nel 2019 *Campylobacter* è stato il terzo agente causale maggiormente segnalato nella UE, dopo *Salmonella* e *Listeria*. È stato riportato da 18 Stati membri, con un totale di 319 focolai, 1.254 casi di malattia, 125 ricoveri e nessun decesso. Diciotto focolai sono stati segnalati con evidenza forte e 301 con evidenza debole. Le fonti di origine alimentare più comuni per i focolai di campilobatteriosi con evidenza forte sono rappresentate da carne di pollo e latte, come negli anni precedenti (EFSA e ECDC, 2021).

In seguito al monitoraggio basato sul criterio di igiene di processo per *Campylobacter* nelle carcasse di polli da carne (Regolamento (CE) n. 2073/2005, allegato I, capitolo 2, punto 2.1.9), sette Stati membri (Bulgaria, Croazia, Cipro, Estonia, Lituania, Romania e Spagna) hanno riportato i risultati dei controlli ufficiali, eseguiti dall'Autorità Competenti, relativi a 3.346 campioni di pelle del collo. Di questi, 1.365 (41%) erano positivi per *Campylobacter* spp. e 506 (15%) avevano superato il limite di 1.000 CFU/g. Sette Stati membri (Danimarca, Estonia, Germania, Irlanda, Lettonia, Romania e Svezia) hanno riportato i risultati di tale monitoraggio sulla base dei campionamenti degli operatori del settore alimentare (OSA). Dei 15.323 campioni di pelle di collo analizzati, 2.038 (13%) sono risultati positivi e 1.033 (7%) hanno superato il limite di 1.000 CFU/g (EFSA e ECDC, 2021).

Per quanto riguarda la proporzione di campioni positivi per *Campylobacter* all'interno delle categorie di alimenti "Ready To Eat (RTE) e "non Ready To Eat", nel 2019 era rispettivamente pari allo 0,2% ed al 20,6%. In 3.691 unità campionarie di alimenti "pronti al consumo o RTE" testate da otto Stati membri, si sono rilevate solo sei unità positive (0,16%) a *Campylobacter*; due da latte crudo, due da "frutta, verdura e succhi", uno da insalate e uno da "altri alimenti trasformati" prodotti e piatti preparati". I risultati relativi a controlli effettuati su alimenti "non pronti per il consumo" da 16 Stati membri hanno dimostrato che la categoria di prodotti "carne e prodotti a base di carne" è risultata la più contaminata (prevalenza del 23,0%), seguita da "latte e prodotti a base di latte" (2,0%) e "frutta, verdura e succhi" (0,2%). *Campylobacter* è stato isolato da tutte le categorie di carne fresca, con prevalenza più elevata in carni fresche di tacchino e pollo, che hanno fatto registrare rispettivamente prevalenze pari al 33,0% ed al 29,6% (EFSA e ECDC, 2021).

Per quanto riguarda il monitoraggio effettuato sugli animali (principalmente su polli da carne e bovini) da sedici Stati membri, la percentuale più elevata di positivi (13%) è stata osservata nei polli da carne (EFSA e ECDC, 2021).

#### 4.1 Patogenesi

L'infezione dipende da più fattori, tra cui la dose del microrganismo ingerito, il consumo di alimenti aventi potere tampone come ad esempio il latte, l'ipocloridia, nonché lo stato di salute, l'età e il grado di immunodeficienza dell'ospite. I *Campylobacter* termotolleranti possiedono numerosi fattori di virulenza tra cui fattori di invasività e tossine ad azione emolitica, intracellulare e citotossica (Colavita et al., 2012).

Per provocare la malattia, infatti, il microrganismo deve aderire e penetrare nelle cellule della mucosa di piccolo e grosso intestino. Il legame con le cellule epiteliali permette al batterio di creare una nicchia di protezione contro il transito dell'alimento o la peristalsi (Joens, 2004; Dasti et al., 2010). A seguito del legame, la penetrazione nelle cellule epiteliali avviene per endocitosi mediata dal batterio stesso, che opera alterando i segnali di membrana. Dopo una fase di moltiplicazione esponenziale che si protrae per circa 72 ore dall'internalizzazione, avviene la traslocazione dei batteri lungo gli strati più profondi di lamina propria e sottomucosa, dove *Campylobacter* viene in contatto con le cellule del sistema immunitario dell'ospite e può essere identificato microscopicamente all'interno di granulociti e mononucleati (Joens, 2004).

La capacità di questi batteri di raggiungere il colon, principale organo target, sarebbe garantita dalla presenza di flagelli, mentre l'invasione della mucosa intestinale è probabilmente la conseguenza del rilascio di citotossine (Silva et al., 2011). Per quanto riguarda *C. coli*, il flagello si compone di due flagelline (FlaA e FlaB) codificate da due geni chiamati *flaA* e *flaB*. Il gene *flaA* sembra essere essenziale nelle fasi di adesione e invasione della mucosa intestinale; la sua soppressione porta infatti alla formazione di un flagello con mobilità notevolmente ridotta perché composto dalla sola subunità FlaB. Inoltre, si è ipotizzato che i flagelli posseggano la capacità di secernere proteine non flagellari in grado di influenzare la risposta immunitaria (Silva et al., 2011). *C. coli* possiede inoltre geni che codificano proteine associate alla capacità invasiva del patogeno (*ciaB* e *pldA*) (Man, 2011).

Il gene *ciaB* codifica per una proteina di 73 kDa che è traslocata nel citoplasma delle cellule eucariotiche e necessaria per l'internalizzazione di *Campylobacter* da parte di cellule fagocitarie facoltative (Konkel et al.,1999).

Il gene *pldA* di *C. coli*, invece, codifica per una fosfolipasi A della membrana esterna che assume un ruolo nella lisi degli eritrociti da parte di *C. coli*. Poiché le emolisi sono intimamente associate al potenziale patogeno di numerosi patogeni batterici, è probabile che la fosfolipasi A svolga un ruolo nella virulenza di *Campylobacter* (Grant et al.,1997).

*C. jejuni*, invece, possiede un flagello polare, anch'esso fondamentale nel processo di adesione alle cellule intestinali. Mutanti di *C. jejuni*, sperimentalmente privati del flagello, mostrano una marcata riduzione della capacità d'invasione cellulare in colture cellulari *in vitro* (Dasti et al., 2010). La formazione del flagello, in *C. jejuni*, è regolata da un sistema a due componenti, un sensore FlgS a cui risponde un regolatore FlgR, a cui si aggiungono altre proteine essenziali per la motilità (FlgP e FlgQ), mentre un gene (*CheY*) che codifica per fattori chemiotattici sembra responsabile del moto rotatorio del flagello stesso (Dasti et al., 2010). Il legame alle cellule epiteliali è stato correlato, per *C. jejuni*, anche alla presenza di altri fattori, tra cui la proteina CadF, presente anche in *C. coli*, una proteina di autotrasporto CapA, una di legame periplasmatico (PEB1) e una lipoproteina di superficie (JlpA). La proteina CadF (*Campylobacter* adhesion antigen to fibronectin) media l'attività di adesione alla superficie cellulare tramite il legame con la fibronectina, una proteina della membrana cellulare, ed inoltre sembra innescare la cascata di segnali che permette l'internalizzazione del batterio. Il gene *cadF*, che codifica per la proteina omonima, differisce in *C. coli* per un'inserzione di 39-bp, che porta ad una marcata riduzione nella capacità di invasione cellulare rispetto a *C. jejuni* (Dasti et al., 2010).

Altro importante fattore di virulenza di *Campylobacter* spp. è la capacità di produrre una tossina denominata Cytolethal Distending Toxin (CDT), prodotta da numerosi batteri Gram-negativi (es: *Haemophilus parasuis* e batteri dei generi *Campylobacter*, *Helicobacter*, *Salmonella*, *Shigella*) e prima tossina batterica scoperta in grado di dare arresto del ciclo cellulare nelle cellule di mammiferi. La CDT si compone di tre subunità A, B e C, codificate rispettivamente da tre differenti geni, *cdtA*, *cdtB* e *cdtC*, ed è in grado di arrestare il ciclo cellulare nella fase G2/M, inibendo la mitosi e provocando la morte della cellula. La subunità attiva della tossina è la *cdtB*, mentre non sono ancora ben noti i ruoli delle subunità *cdtA* e *cdtC*. Si ipotizza che queste siano comunque fondamentali per la penetrazione della subunità attiva all'interno delle cellule

epiteliali della mucosa intestinale. In questo modo la *cdtB* può penetrare nella cellula e venir trasportata, attraverso l'apparato di Golgi, al reticolo endoplasmatico da cui raggiunge il nucleo tramite un meccanismo di trasporto retrogrado. Una volta penetrata nel nucleo, la *cdtB*, può bloccare l'attività della CDC2 chinasi, che permette l'ingresso in mitosi tra le fasi G2 ed M del ciclo cellulare, bloccando il ciclo stesso (Silva et al., 2011).

È stato dimostrato, inoltre, che la CDT è responsabile nell'uomo della produzione di interleuchina 8 (IL-8) con conseguente richiamo di macrofagi, cellule dendritiche e granulociti neutrofili nel sito di invasione, inducendo flogosi a livello intestinale (Dasti et al., 2010). Questa tossina è presente sia in *C. jejuni* che *C. coli*, ma anche in altri *Campylobacter* spp. come *C. foetus* subsp. *foetus* e subsp. *venerealis*, *C. hyointestinalis*, *C. lari* e *C. uspaliensis* (Dasti et al., 2010; Silva et al., 2011; Man, 2011).

Altre tossine prodotte da questi batteri comprendono delle emolisine, come nel caso di *C. coli*, o un'enterotossina, come per *C. hyointestinalis* subsp. *hyointestinalis* (Man, 2011). Sebbene dai dati disponibili si possa ipotizzare la partecipazione dell'enterotossina nel processo patogenetico intestinale, somministrazioni intragastriche di questa tossina, anche in dosi massicce, su ospiti maturi ed immaturi, immunocompetenti o immunodepressi, non sono esitate nella manifestazione gastrointestinale classica conseguente all'infezione; rimane quindi da chiarire se e in che modo l'enterotossina possa contribuire al danno alla barriera intestinale (Jinadasa et al., 2011).

La resistenza di questi microrganismi all'interno dell'ospite e nell'ambiente sembra essere legata anche alla loro capacità di unirsi in aggregati incapsulati all'interno di una sostanza polimerica extracellulare che rimane adesa a diverse superfici, ovvero in un biofilm. La formazione di biofilm è stata descritta per *C. jejuni* su tessuto umano di origine ileale, ma la possibilità di creare biofilm su superfici quali vetro, acciaio inossidabile o polistirene è stata descritta, oltre che per *C. jejuni*, anche per *C. coli*, *C. hyointestinalis* e numerosi altri *Campylobacter* spp. emergenti (Man, 2011).

Ancora non è noto l'esatto ruolo del biofilm nella patogenesi delle infezioni da *Campylobacter* spp.; si ipotizza, però, che possa facilitare la colonizzazione della cavità orale favorendo la comparsa di periodontiti (Man, 2011).

## 4.2 Quadri clinici nell'uomo

La maggior parte delle infezioni da *Campylobacter* è sporadica e autolimitante. Nell'uomo, la campilobatteriosi si manifesta principalmente come una patologia enterica caratterizzata da diarrea infiammatoria acquosa e, talvolta, emorragica, con dolori addominali, vomito e febbre ondulante (García-Sánchez et al., 2018). Tuttavia, *Campylobacter* è stato associato a un'ampia gamma di malattie gastrointestinali, come la Malattia Infiammatoria Intestinale (IBD), l'esofago di Barrette cancro del colon-retto e può anche essere responsabile di problemi non gastrointestinali a cui seguono danni a lungo termine (García-Sánchez et al., 2018).

Tra le complicazioni si riscontra principalmente la sindrome di Guillain-Barré (GBS), una malattia autoimmune del sistema nervoso periferico e caratterizzata da demielinizzazione delle guaine mieliniche che rivestono i neuroni e conseguente paralisi flaccida (Nachamkin et al., 1998). Altre possibili sequele comprendono lo sviluppo di un'artrite immuno-mediata (Helms et al., 2006) e di un'artrite reattiva (Dooruyt et al., 2008), condizioni caratterizzate da tumefazioni dolorose alle articolazioni che possono durare da settimane ad anni. Uno studio suggerisce inoltre che l'infezione da *C. jejuni* possa essere uno dei fattori implicati nello sviluppo del morbo di Crohn (Lamhonwah et al., 2005).

I fattori di rischio per contrarre l'infezione sono rappresentati dal consumo e dalla manipolazione di carni avicole crude o poco cotte (Friedman et al., 2000; Studha e Andersson, 2000), prodotti avicoli, latte non pastorizzato (Doyle et al., 1982; EFSA, 2006; Arun, 2008) e cibi crudi che hanno subito una possibile cross-contaminazione con carni avicole contaminate dal batterio. A queste cause prettamente di origine alimentare si aggiunge il possibile consumo di acqua contaminata da *Campylobacter* a seguito di scarichi derivanti da impianti di macellazione del pollame (Blaser et al., 1984; Rosef et al., 2001).

La vera incidenza della campilobatteriosi dell'uomo risulta di difficile stima a causa di una serie di ragioni. La prima è legata al fatto che la patologia enterica è autolimitante e spesso la persona ammalata non la riporta al proprio medico curante; la diarrea, inoltre, in genere viene trattata in maniera sintomatica e non vengono eseguiti test diagnostici. Un altro motivo a favore di tale sottostima risiede nel fatto che le strutture sanitarie in cui i pazienti sono ricoverati in caso di complicazioni non eseguono test diagnostici finalizzati ad una diagnosi eziologica. Infine, quando la malattia è di origine alimentare, spesso l'alimento incriminato non è più disponibile per le analisi microbiologiche (Franco e Williams, 2001).

#### 4.2.1. *Campylobacter* e la sindrome di Guillan – Barré

La sindrome di Guillain-Barré (GBS) è una poliradiculoneuropatia acuta infiammatoria immuno-mediata che si presenta tipicamente con formicolio, debolezza progressiva, disfunzione autonoma e dolore (Wijdicks et al., 2017; Anandan et al., 2017). La reazione auto-immune è rivolta in modo specifico alla guaina mielinica e ai relativi componenti delle cellule di Schwann nella poliradiculoneuropatia demielinizzante infiammatoria acuta (AIDP), mentre nella neuropatia assonale motoria acuta (AMAN) la membrana dell'assone (assolemma) è il target primario della reazione autoimmune. L'incidenza della GBS varia da 0,8 a 1,9 casi per 100.000 persone all'anno, aumenta con l'età ed è leggermente più frequente nei maschi che nelle femmine (Rodríguez et al., 2018).

I casi di GBS segnalati sono più frequentemente correlati all'infezione da *C. jejuni*, ma possono entrare in gioco anche altri agenti, come Zika Virus (ZIKV) (Rodríguez et al., 2018). Per quanto riguarda *Campylobacter*, la sindrome di Guillain-Barre è spesso associata a sierotipi meno comuni nelle enteriti non complicate. In particolare, ha una certa rilevanza il sierotipo Penner, determinato da un polisaccaride capsulare distinto dal lipopolisaccaride (Hadden e Gregson, 2001).

In Giappone il 52-77% dei pazienti con GBS associato a *C. jejuni* presenta il sierotipo Penner O:19, mentre in Germania il 93% dei pazienti presenta il sierotipo Lior 11 e in Sud Africa dal 53% dei pazienti è isolato il sierotipo Penner O:41 (Hadden e Gregson, 2001). Nella sua fase acuta la GBS può causare disabilità grave e in alcuni casi portare a morte (Poropatich et al., 2010).

Nuovi progressi nel campo della campilobatteriosi umana hanno portato ad una maggiore comprensione del ruolo di *C. jejuni* nelle sequele post-infettive, delle malattie associate a *Campylobacter* e dell'interazione tra l'immunità dell'ospite e i fattori batterici di patogenicità. Nel 30-40% dei casi di GBS è evidenziata una precedente infezione da *C. jejuni*. Inoltre, è stato stimato che 1,17/1000 infezioni da *C. jejuni* esitano in GBS (Rodríguez et al., 2018).

I pazienti con GBS correlata a infezioni da *C. jejuni* producono frequentemente anticorpi contro i gangliosidi dei nervi periferici umani attraverso il mimetismo molecolare. L'antigene batterico cross-reattivo è riconosciuto dai macrofagi e dai linfociti T che inducono i linfociti B a produrre una risposta anticorpale anti-ganglioside: gli anticorpi vengono riversati nel circolo sanguigno, superano la barriera nervosa e attivano il complemento. Questi anticorpi si legano sia ai gangliosidi dei nervi che agli antigeni dei batteri. I macrofagi endoneurali attivati rilasciano

citochine e radicali liberi (per esempio ossido nitrico), invadono la mielina compatta, lo spazio peri-assonale e occasionalmente bloccano la conduzione nervosa o causano degenerazione assonale (Rodríguez et al., 2018). Il rilascio di cellule T attivate e citochine proinfiammatorie fissano il complemento, danneggiano le cellule di Schwann e infine dissolvono la mielina (Rodríguez et al., 2018).

La GBS può essere suddivisa in sottotipo demielinizzante e assonale. La GBS sottotipo demielinizzante è una polineuropatia demielinizzante infiammatoria acuta (AIDP) caratterizzata da demielinizzazione dei neuroni, mentre la demielinizzazione è assente nei sottotipi assonali che causano invece la neuropatia assonale motoria acuta (AMAN) e la neuropatia assonale sensitivo-motoria acuta (AMSAN). L'AIDP si manifesta in genere in Nord America e in Europa, mentre AMAN/AMSAN sono state più comunemente riscontrate in Cina, Giappone e Messico. Sebbene entrambi i sottotipi siano associati a infezioni dovute a *Campylobacter*, è stato dimostrato che *Campylobacter* è più frequentemente associato all' AMAN (Rodríguez et al., 2018).

## 5. Strategie di prevenzione

Sebbene i *Campylobacter* siano stati generalmente considerati sensibili al di fuori di ospiti e serbatoi, in realtà sono più resistenti di quanto si pensasse, grazie al passaggio delle cellule batteriche nello stato "vitale ma non coltivabile" (VBNC) (Humphrey et al., 2007). È ormai riconosciuto che i *Campylobacter* nello stato VBNC possono portare alla loro sottostima o al loro mancato isolamento mediante tecniche colturali, anche se le cellule in questo stato possono ancora infettare ospiti suscettibili (pollame o esseri umani) (Saha e Sanyal, 1991).

La migliore strategia per ridurre i casi di campilobatteriosi umana è la diminuzione del livello di colonizzazione intestinale da *Campylobacter* soprattutto nel pollo da carne. Ciò rappresenta una vera e propria sfida a causa della diffusione e del comportamento commensale di questo batterio nell'intestino dei broiler. Già dagli anni '90 diversi paesi dell'Unione Europea hanno adottato varie strategie per il contenimento dell'infezione nel pollame. Tra queste, quelle attuate in Danimarca comprendevano iniziative a tre livelli, ed in particolare nella catena di produzione, nel trattamento della carne e nell'educazione dei consumatori. Durante questi anni, si è rilevata una diminuzione dei soggetti positivi per *Campylobacter* al momento della macellazione (Rosenquist et al., 2009).

Possiamo distinguere diversi livelli di controllo della campilobatteriosi:

1. Misure di biosicurezza, per evitare che gli animali si contaminino e che avvenga la trasmissione tra i diversi lotti;
2. Misure nutrizionali, attraverso l'utilizzo di vari composti, come oli essenziali, pre e probiotici, batteriocine e batteriofagi;
3. Misure di vaccinazione, che consistono nel modificare la recettività dell'animale nei confronti di un agente patogeno;
4. Trattamenti decontaminanti sugli alimenti;
5. Campagne d'informazione rivolte al consumatore finale.

### 5.1 Strategie di prevenzione nell'allevamento di polli da carne

Alla produzione primaria sarebbe necessaria l'applicazione di una strategia di intervento multistrato con approcci di intervento sequenziali mirati ai diversi eventi che caratterizzano il ciclo di infezione. L'approccio primario sarebbe prevenire l'ingresso di *Campylobacter*

nell'allevamento (principalmente attraverso misure di biosicurezza). Se fallisse questo approccio, il passo successivo consisterebbe nel ridurre la suscettibilità dell'allevamento all'infezione (ad esempio mediante l'uso di additivi per mangimi e acqua, la vaccinazione, o allevamenti di linee di polli geneticamente selezionati per la resistenza a *Campylobacter*). Entrambe le opzioni di controllo dovrebbero ridurre nell'ambiente e nella catena alimentare il numero dei soggetti positivi per *Campylobacter*. Se entrambi questi approcci non riuscissero a prevenire l'infezione, il passo successivo consisterebbe nel ridurre la concentrazione intestinale di *Campylobacter* durante l'allevamento (ad es. mediante l'impiego con batteriofagi o batteriocine). Le fasi successive all'allevamento saranno caratterizzate dall'applicazione di strategie che hanno l'obiettivo di migliorare le fasi di lavorazione e prevedere operazioni di decontaminazione delle carcasse risultate positive al macello. (EFSA, 2011).

### 5.1.1 Biosicurezza

La biosicurezza è un insieme di misure preventive attuate per ridurre il rischio di trasmissione di una malattia infettiva dai serbatoi dell'agente infettivo all'ospite bersaglio. Chiaramente i piani di biosicurezza vengono redatti in base alle necessità e variano a seconda delle circostanze; alcuni rischi saranno generici e globali mentre altri dipendono dal tempo, dal luogo, dalla disponibilità delle risorse, ecc. (EFSA, 2011)

Un allevamento convenzionale, moderno, ben tenuto e con accesso limitato, dovrebbe essere considerato biosicuro. Se la biosicurezza è implementata in modo rigoroso e coerente, allora nessun *Campylobacter* (o altri agenti patogeni) viene portato dall'esterno all'interno dell'allevamento. Tuttavia, in pratica è molto difficile ottenere e mantenere un tale livello di biosicurezza. Il perimetro di biosicurezza in un allevamento può essere oltrepassato passivamente attraverso beni essenziali come acqua, mangime e aria. Il superamento attivo di tale perimetro invece richiede il trasporto di *Campylobacter* dall'ambiente esterno, che può verificarsi tramite vettori come parassiti o insetti volanti/striscianti, ma soprattutto tramite l'uomo. Una volta che *Campylobacter* entra nell'allevamento e infetta i primi volatili, la diffusione è molto rapida e praticamente tutti gli animali vengono colonizzati entro una settimana. Pertanto, l'obiettivo principale delle misure di biosicurezza è quello di controllare l'ingresso di *Campylobacter* nell'allevamento (EFSA, 2011).

La biosicurezza negli allevamenti all'aperto richiede un approccio diverso. La recinzione, che consente l'accesso limitato di fauna selvatica, insetti e roditori può controllare solo in parte la diffusione del microrganismo. I componenti di biosicurezza generica, quali acqua e mangime puliti, cambio degli stivali per accedere all'allevamento e lavaggio delle mani, vaccinazione, ecc. devono essere comunque applicati per fornire un ulteriore grado di protezione. Nonostante l'applicazione di queste misure, il livello di biosicurezza è insufficiente per il controllo di *Campylobacter* e ne spiega la maggior prevalenza negli allevamenti all'aperto e biologici (EFSA, 2011).

### 5.1.2 Barriere igieniche

Le barriere igieniche all'ingresso degli allevamenti sono importanti per la biosicurezza in un allevamento; possono variare per posizione, struttura e, soprattutto, uso. Lo scopo delle barriere igieniche dovrebbe essere quello di separare fisicamente l'ambiente esterno "sporco" da quello interno "pulito e protetto".

Nelle situazioni più elementari, le barriere igieniche consistono in un punto fisico in corrispondenza del quale è necessario indossare stivali e indumenti/tute utilizzati esclusivamente per quell'allevamento, oppure copri-calzari monouso e ove vi sono a disposizione impianti per il lavaggio delle mani (Bouwknegt et al., 2004). Il rispetto rigoroso delle procedure da svolgere a livello di queste barriere riduce il rischio di infezione in allevamento del 50% (Berndtson et al., 1996; Evans e Sayers, 2000; van de Giessen et al., 1998), ed è particolarmente importante quando sono presenti altri animali da reddito e da compagnia in azienda (Hald et al., 2000; van de Giessen et al., 1992).

### 5.1.3 Zanzariere

Un approccio relativamente nuovo per incrementare il livello di biosicurezza consiste nel prevenire l'ingresso di insetti nell'allevamento tramite l'utilizzo di zanzariere. Studi intrapresi in Danimarca (Hald et al., 2007) hanno dimostrato che l'esclusione degli insetti volanti dall'allevamento può ridurre significativamente l'incidenza di *Campylobacter* durante il picco stagionale della loro diffusione (EFSA, 2011).

#### 5.1.4 Acqua di bevanda

Un altro fattore legato alla biosicurezza è la qualità dell'acqua. Diversi studi hanno dimostrato che l'utilizzo di acqua di scarsa qualità (cioè l'acqua non potabile, proveniente dai pozzi), è correlato ad un aumento del rischio di infezione da *Campylobacter*, che infatti si isola spesso da fonti d'acqua non trattata (Guerin et al., 2007; Lyngstad et al., 2008; Sparks, 2009; Stern e Pretanik, 2006).

Chiaramente, se l'utilizzo di acqua di qualità inferiore a quella dell'acqua potabile è l'unica opzione, sarà necessario implementare le misure per trattare l'acqua in azienda (mediante clorazione, filtrazione o irraggiamento UV) anche se l'impatto di tali interventi sull'infezione da *Campylobacter* rimane poco chiaro (Gibbens et al., 2001; Mohyla et al., 2007; Pearson et al., 1993).

La clorazione di routine è considerata completamente efficace contro *Campylobacter*. Tuttavia, sebbene nella maggior parte degli Stati membri gli allevamenti intensivi siano forniti di acqua potabile, i livelli di clorazione possono variare tra le regioni all'interno dei singoli Stati membri e livelli relativamente bassi di clorazione dell'acqua potabile dell'allevamento (da 2 a 5 parti per milione) sono apparentemente inefficaci nel diminuire la colonizzazione di *Campylobacter* (Stern et al., 2002), in quanto il batterio è in grado di persistere all'interno di protozoi e biofilm parzialmente resistenti ai disinfettanti (Cox e Pavic, 2010).

#### 5.1.5 Riduzione dell'età di macellazione

L'età di macellazione è direttamente correlata all'aumento di diffusione del microrganismo in allevamento, tant'è che la macellazione di lotti di animali più giovani è una strategia efficace per il controllo della diffusione di *Campylobacter* (EFSA, 2011).

In Svezia (Berndtson et al., 1996), la maggior parte dei lotti di polli viene macellato a 33-35 giorni di età, poiché aumentando l'età di macellazione a 42-44 giorni si è dimostrato un raddoppio della positività in allevamento, che aumentava fino a quattro volte se la macellazione veniva protratta a 48-61 giorni.

Dati pubblicati da EFSA (2010b) hanno dimostrato che il rischio di infezione da *Campylobacter* raddoppia ogni 10 giorni di vita degli animali.

### 5.1.6 Variazione nel numero di capi del capannone

In alcuni allevamenti la macellazione dell'intero lotto di animali allevati nello stesso capannone può avvenire in tempi diversi, intervallati di alcuni giorni. Questa pratica di macellazione aumenta notevolmente il rischio di contrarre l'infezione, per gli animali che rimangono in allevamento (EFSA, 2011).

L'abolizione della pratica del "diradamento" riduce il rischio di infezione da *Campylobacter*, sia per la riduzione dell'età di macellazione (assumendo che tutti i volatili siano macellati contemporaneamente), sia per la riduzione della comunicazione tra ambiente esterno e ambiente interno dell'allevamento. Il diradamento di un gruppo prevede infatti l'ingresso nel capannone di personale addetto alla cattura dei polli, gabbie e materiali provenienti dall'esterno che potrebbero contaminare l'ambiente (EFSA, 2011).

I dati di EFSA (2010b) dimostrano come la macellazione di lotti precedentemente diradati sia soggetta ad un rischio significativamente più elevato di colonizzazione da *Campylobacter* rispetto ai lotti macellati in un unico conferimento.

### 5.1.7 Batteriocine

Le batteriocine sono tossine proteiche prodotte da batteri per inibire la crescita di ceppi batterici simili o strettamente correlati. La maggior parte delle batteriocine mostra attività antibatterica solo contro batteri correlati al ceppo produttore, mentre altre presentano un'attività ad ampio spettro. Lin (2009) ha esaminato l'anti-batteriocina di *Campylobacter* per il suo utilizzo nella riduzione della presenza di *Campylobacter* (*C. jejuni* e *C. coli*) nel pollame.

Attualmente sono quattro le batteriocine purificate conosciute in grado di ridurre la colonizzazione di *Campylobacter* nei polli: SRCAM 602 prodotta da *Paenibacillus polymyxa* NRRL B-30509 (Stern et al., 2005), OR-7 da *Lactobacillus salivarius* (Stern et al., 2006), E-760 ed E 50-52 da *Enterococcus spp.* (Line et al., 2008; Svetoch et al., 2008).

Sperimentalmente l'utilizzo di batteriocine, somministrate poco prima della macellazione, riduce a livelli non rilevabili la colonizzazione di *Campylobacter* nei polli da carne. Tuttavia, la convalida sul campo della reale efficacia delle batteriocine non è ancora stata attuata e le stime attuali si basano su esperimenti di laboratorio, anche se promettenti (EFSA, 2011).

### 5.1.7 Batteriofagi

L'attività litica dei batteriofagi può essere utilizzata contro *Campylobacter*. Tali fagi di solito hanno spettro d'ospite ristretto e non interagiscono con altre specie batteriche (ad esempio, flora intestinale). I fagi aderiscono e penetrano nelle cellule batteriche attraverso un recettore, in genere di natura proteica; all'interno della cellula avviene la loro replicazione e i fagi prodotti vengono rilasciati dalla lisi della cellula ospite per riprendere il ciclo in un altro ospite. Se il recettore si modifica, *Campylobacter* può diventare resistente al fago (EFSA, 2011). Per il controllo di *Campylobacter*, i batteriofagi sono solitamente proposti come terapeutici, piuttosto che come prevenzione della colonizzazione in allevamento. La strategia consiste nel trattare i lotti di polli da due a tre giorni prima della macellazione, in questo modo gli allevamenti trattati non saranno liberi da *Campylobacter*, ma si avrà una riduzione della concentrazione di *Campylobacter* nel contenuto cecale.

La riduzione dei livelli cecali di *Campylobacter* di 0,5-5 log<sub>10</sub> (El-Shibiny et al., 2009; Loc Carrillo et al., 2005; Wagenaar et al., 2005) dipende dai tempi di somministrazione, dalla dose dei fagi e dalle combinazioni fago-*Campylobacter*. Inoltre, l'efficacia della terapia fagica dipende dalla presenza dei livelli soglia di suscettibilità di *Campylobacter*, in quanto meno efficace se applicato nelle prime fasi di colonizzazione.

La coevoluzione fago-ospite è complessa. Le prove sperimentali hanno dimostrato che l'idoneità ecologica di ceppi di *Campylobacter* sono correlati alla loro suscettibilità ai fagi. L'utilizzo della terapia fagica su larga scala e globale comporterebbe un cambiamento nell'epidemiologia dei ceppi di *Campylobacter* difficile da valutare (Scott et al., 2007).

Attualmente non esiste una normativa UE specifica sull'uso dei fagi nella produzione primaria.

In condizioni sperimentali l'uso dei fagi sembra promettente, ma a livello produttivo le complessità sono diverse: sono necessarie più popolazioni di fagi in quanto i *Campylobacter* hanno recettori diversi, ed inoltre vi sono problemi di sicurezza legati alla coltura di massa di ceppi di *Campylobacter*, potenzialmente patogeni, per la produzione di fagi. Teoricamente, l'applicazione dovrebbe essere fatta poco prima della macellazione e questo genera problemi logistici. Anche lo sviluppo di ceppi resistenti e la loro distribuzione in allevamento potrebbero complicare il monitoraggio continuo dei profili dei fagi. Per questi motivi, l'uso dei batteriofagi è piuttosto limitato (EFSA, 2011).

### 5.1.8 Vaccinazione

Dal momento che le misure di biosicurezza possono presentare lacune, la vaccinazione potrebbe essere utilizzata per una maggiore efficacia, essendo comunemente riconosciuta come la strategia più efficace per prevenire le malattie infettive da patogeni batterici e virali. La vaccinazione potrebbe ridurre o addirittura prevenire la colonizzazione di *Campylobacter* e in entrambi i casi influenzare il numero di microrganismi che entrano nella catena alimentare e nell'ambiente.

Tuttavia, un vaccino per il pollo nei confronti di *Campylobacter* non è stato ancora sviluppato, nonostante le numerose sperimentazioni (Meunier et al., 2018)

I fattori che incidono negativamente sull'efficacia della vaccinazione sono legati alla tempistica di somministrazione in animali macellati a 6 settimane di vita e alla presenza di anticorpi materni fino a 2-3 settimane dopo la schiusa. L'obiettivo, dunque, è quello di creare un vaccino somministrabile ad animali immunologicamente immaturi, che non venga inibito dagli anticorpi materni e che induca una risposta della mucosa intestinale entro 2-3 settimane dalla schiusa (EFSA, 2011).

Esistono diversi tipi di vaccini; tra quelli più studiati vi sono i vaccini a sub-unità per la cui produzione risulta fondamentale la scelta dell'antigene target; bisogna infatti prendere in considerazione l'immunogenicità dell'antigene, la sua localizzazione su batteri vivi, l'interazione tra patogeno-ospite e la virulenza (Nielsen et al, 2012).

Numerose proteine extracitoplasmatiche di *Campylobacter* sono state testate per lo sviluppo di vaccini somministrati per via orale, nasale e parenterale. Tra queste, le proteine più frequentemente oggetto di studio sono CJAA (proteina legante soluto, componente del sistema di trasporto ABC), CJAD (proteina peptidoglicano-binding), FlaA (flagellina) e Cmec (componente esterno-membrana CmeABC). Una buona immunizzazione si è osservata anche con SodB (superossido dismutasi), che è una proteina citoplasmatica (Chintoan-Uta et al., 2015).

Attualmente, i risultati ottenuti dalla somministrazione di vaccini attraverso diversi schemi e vie determinano livelli di protezione molto differenti tra loro (Zeng et al, 2010; Theoret et al, 2012; Neal-McKinney et al, 2014), anche quando è utilizzato lo stesso antigene. Le discrepanze osservate, dunque, sono legate anche alle varie linee cellulari di pollo utilizzate per le sperimentazioni e alle differenze della flora intestinale (Rubin et al, 2010; Pan e Yu, 2014;

Indikova et al, 2015). La risposta immunitaria, infine, dipende anche dalla razza del broiler (Humphrey et al., 2014).

Kobierecka et al. (2016) hanno testato la somministrazione nell'uovo della proteina ibrida rCjaAD, utilizzando le particelle GEM e i liposomi neutri come vettori di antigeni di *Campylobacter*. Tali vaccini sono stati somministrati nel sacco amniotico embrionale al 18° giorno, quando il sistema immunitario dell'embrione è in grado di rispondere all'antigene. I risultati ottenuti indicano una significativa riduzione della colonizzazione. La tecnica dell'immunizzazione "in ovo", da tempo ampiamente utilizzata nel settore del pollame per prevenire le malattie virali (Negash et al., 2004), rappresenta quindi una strategia facile da applicare per la vaccinazione di massa ed è soprattutto più efficiente rispetto alle altre vie di somministrazione.

Un altro vaccino a subunità sfrutta il potere immunogeno della flagellina Flaa, componente principale dei flagelli batterici che svolgono un ruolo cruciale nella colonizzazione batterica. Neal-McKinney et al. (2014) hanno dimostrato che gli uccelli vaccinati con flagellina ricombinata con l'adiuvante Montanide hanno avuto una riduzione della concentrazione intestinale di 3 log<sub>10</sub> CFU/g rispetto al gruppo di controllo ed anche una maggiore reattività specifica. Tuttavia, nonostante i risultati promettenti, la flagellina non può essere utilizzata come antigene su larga scala per la vaccinazione a causa delle differenze strutturali della flagellina stessa tra i diversi ceppi di *Campylobacter* e la mancata protezione crociata tra i vari ceppi sensibili.

Allo stato attuale, dunque, sono necessarie ulteriori indagini per la formulazione di un vaccino a subunità che abbia effetto terapeutico e applicabile su larga scala (EFSA, 2011).

### **5.1.9. Allevamento selettivo**

Di particolare interesse è lo studio riguardante la correlazione tra le linee genetiche dei polli e i livelli di colonizzazione del batterio, che possono essere ridotti di 10-100 volte.

Psifidi et al, (2016) per studiare l'architettura genetica della resistenza alla colonizzazione, influenzata dalla genetica dell'ospite, hanno preso in considerazione due gruppi di studio: un incrocio di due linee consanguinee derivate dalla White Livorno e una linea avanzata di intercross di 9a generazione.

La colonizzazione intestinale da *Campylobacter* è un tratto quantitativo complesso ereditabile sotto il controllo genetico di più loci, geni e varianti di sequenza collegate.

Dall'analisi del genoma, tramite una piattaforma di genotipizzazione mirata, è emerso che la resistenza a *Campylobacter* è un tratto complesso, che può coinvolgere il Complesso Maggiore di Istocompatibilità, risposte immunitarie innate e adattative, caderine e altri fattori. I loci per i caratteri quantitativi (quantitative trait loci QTL) per la resistenza sono localizzati sui cromosomi 7, 11 e 14 e due di questi sono collocati insieme ai loci di resistenza a *Salmonella*, il che indica che la selezione di queste linee genetiche potrebbe portare ad una maggior resistenza nei confronti di entrambe le zoonosi contemporaneamente.

Queste osservazioni inducono a pensare che l'allevamento selettivo potrebbe essere portare a polli resistenti a *Campylobacter* (Kaiser et al., 2009).

## 5.2 Strategie di prevenzione durante il trasporto e nelle fasi prima della macellazione

Il tempo di trasporto e di attesa della macellazione in Europa varia notevolmente e dipende dalla distanza tra allevamento e macello, ma anche dall'organizzazione e dalla competenza dell'impresa; idealmente, i macelli dovrebbero essere situati vicino agli allevamenti. La somministrazione del cibo, e a volte dell'acqua, viene sospesa prima della spedizione degli animali al macello, al fine di ridurre il contenuto del tratto gastrointestinale, e di conseguenza il volume delle feci escrete durante il trasporto. L'aspettativa è che ciò contribuisca a ridurre la diffusione di *Campylobacter* nell'ambiente e sulle carcasse (Bilgili, 2002; FAO/WHO, 2009a, 2009c; FSIS/USDA, 2008a; Keener et al., 2004; Thompson e Applegate, 2008).

I tempi di sospensione dell'alimentazione devono essere tali da garantire, oltre allo svuotamento fisico, l'integrità del tratto gastrointestinale; infatti, se superiori a 12 ore potrebbero causare il deterioramento delle condizioni e dell'integrità dei visceri, e aumentare la fluidità del contenuto gastrointestinale e il rischio di contaminazione fecale delle carcasse. Occorre ricordare a tal proposito che lo stesso Regolamento CE 1099/2009 relativo alla protezione degli animali durante l'abbattimento fissa il limite di sospensione dell'alimentazione a 12 ore a garanzia del benessere animale. Ancora EFSA dichiara che il tempo di ritiro, trasporto e sospensione dell'alimentazione prima della macellazione dovrebbe essere compreso tra 8 e 12 ore (EFSA, 2011).

Le corrette pratiche di gestione della dieta consentono perciò di ottimizzare i benefici della sospensione del mangime ed evitare potenziali effetti negativi. Oltre alla sospensione del mangime, per ridurre il livello di contaminazione si possono aggiungere all'acqua potabile additivi in grado di acidificarla, come ad esempio l'acido lattico (EFSA, 2011).

In Europa, gli animali vengono solitamente trasportati dall'allevamento all'impianto di macellazione in sistemi modulari, costituiti in genere da telai metallici in cui sono incastrate cassette di plastica. I polli da carne (e successivamente le carcasse) provenienti da allevamenti non infetti possono essere contaminati esternamente da *Campylobacter* a causa del trasporto in cassette precedentemente contaminate dalle feci di gruppi infetti (Berrang et al., 2003; Bull et al., 2006; Hansson et al., 2005; Hiett et al., 2002; Rasschaert et al., 2007; Slader et al., 2002).

Per questo motivo, sia i moduli che i contenitori devono essere lavati e disinfettati dopo ogni utilizzo per ridurre la contaminazione crociata tra gruppi *Campylobacter* positivi e negativi, a vantaggio dell'igiene nell'impianto di macellazione (Allen et al., 2008a). Questo di solito viene fatto tramite sistemi di pulizia meccanizzati. Il lavaggio delle gabbie di trasporto con acqua e disinfettante riduce il livello di *Campylobacter*, ma talvolta non elimina completamente il patogeno. Numerosi studi hanno infatti dimostrato che i contenitori possono essere ancora contaminati da *Campylobacter* e/o *Salmonella* perché difficili da pulire e igienizzare, presentando numerose nicchie per l'accumulo di patogeni e formazione di biofilm (Corry et al., 2002; Hansson et al., 2005; Stern et al., 2001b).

La rimozione completa delle feci dalle cassette di trasporto è difficile, dispendiosa in termini di tempo, costosa e richiede grandi quantità di acqua. Inoltre, l'uso di acqua riciclata contaminata nel lavaggio e livelli non corretti di disinfettante riducono ulteriormente l'efficacia del lavaggio (Corry et al., 2002).

Pertanto, le cassette di trasporto costituiscono una potenziale fonte di contaminazione crociata tra diversi lotti di polli, nonché di contaminazione indiretta dell'ambiente di macellazione e di lavorazione delle carcasse (Allen et al., 2008a; Bailey et al., 2001; Corry et al., 2002; Newell et al., 2001; Rigby et al., 1980; Slader et al., 2002).

### 5.3 Strategie di prevenzione durante la macellazione, la preparazione e la lavorazione delle carni

Nell'indagine eseguita dall'EFSA nel 2008 è emerso come nella maggior parte dei paesi della UE il punto di partenza dell'industria avicola, cioè il macello, corrisponda al punto di ingresso dell'infezione nel processo produttivo (EFSA, 2010b). Ciò aumenta la pressione sulla sicurezza alimentare nei macelli, in cui il sistema di gestione è basato principalmente su misure igieniche (buone prassi di lavorazione GMP/ buone prassi di igiene GHP) e sull'attuazione del sistema HACCP (Hazard Analysis and Critical Control Points), sistemi che già da soli, se rigorosamente applicati, riducono significativamente il livello di *Campylobacter* (EFSA, 2011).

Oltre a queste misure, sono in fase di indagine altre tipologie di intervento per ridurre ulteriormente il carico microbico sugli alimenti immessi sul mercato.

#### 5.3.1 Prevenzione della fuoriuscita del contenuto intestinale

Diversi studi mostrano che le differenze nella prevalenza di *Campylobacter* derivano da differenti pratiche di macellazione (EFSA, 2005; Rosenquist et al., 2006). Le diverse operazioni di processo, quali scottatura, spiumatura, eviscerazione, lavaggio e refrigerazione hanno un impatto significativo sulla prevalenza di *Campylobacter* in carcasse di pollo da carne contaminate.

Vari studi hanno dimostrato o confermato che la progettazione igienica delle apparecchiature è importante per ridurre al minimo la contaminazione e la crescita di agenti patogeni (Luning et al., 2008).

Nel processo di macellazione la contaminazione può verificarsi in particolare durante l'operazione di eviscerazione, soprattutto se le macchine utilizzate non sono in grado di adattarsi alla variazione naturale delle dimensioni delle carcasse all'interno di un lotto (EFSA, 2011). Di conseguenza, può verificarsi la rottura dei visceri e il rilascio del contenuto intestinale può contaminare le carcasse eviscerate (Figueroa et al., 2009).

La rottura viscerale provoca un aumento di  $0,9 \log_{10}$  CFU di *Campylobacter* per carcassa. La sua diffusione in seguito alla rottura dell'intestino viene ridotta mediante la rimozione fisica del materiale fecale o la progettazione delle apparecchiature dal punto di vista igienico (Boysen e Rosenquist, 2009). Alcuni macelli infatti hanno dimostrato di controllare meglio la

contaminazione rispetto ad altri, migliorando il processo di macellazione (Seliwiorstow et al. 2016).

### 5.3.2 Macellazione programmata

Per macellazione programmata s'intende l'identificazione di gruppi positivi a *Campylobacter* spp. prima che siano macellati, destinando questi lotti a trattamenti dedicati come il congelamento, il trattamento con calore o altre misure di riduzione del microrganismo. Questa pianificazione viene utilizzata in Norvegia, Islanda e Danimarca.

Per poter utilizzare la macellazione programmata, i lotti devono essere campionati prima della macellazione, quindi i risultati delle prove devono essere disponibili prima dell'inizio del processo di macellazione, preferibilmente prima del trasporto al macello. Lo sviluppo di test rapidi e di semplice esecuzione ha reso possibile l'applicazione di questa misura di prevenzione, particolarmente importante poiché molti allevamenti diventano positivi negli ultimi giorni prima della macellazione (EFSA, 2011). Ne è un esempio la Norvegia, dove con un'età media di macellazione di circa 32 giorni l'esecuzione del test quattro giorni prima della macellazione, invece che sette, ha registrato un aumento della percentuale degli allevamenti positivi dal 50% al 75% (Hofshagen et al., 2010).

### 5.3.3 Macellazione logistica

La macellazione logistica consiste nel macellare i lotti di animali positivi dopo i lotti negativi, per evitare la contaminazione crociata tra i lotti. Molti macelli oggi svolgono macellazioni logistiche sulla base di campioni analizzati per *Salmonella*. I campioni però vengono prelevati da due a tre settimane prima della macellazione, troppo presto per essere rilevanti nell'individuare lo stato di infezione da *Campylobacter* dell'allevamento. Inoltre, potrebbe esserci un conflitto tra la macellazione logistica per *Salmonella* e quella per *Campylobacter* (EFSA, 2011).

Alcuni studi, tuttavia, hanno dimostrato il numero di carcasse di un lotto negativo contaminato da un lotto positivo macellato appena prima è piuttosto limitato e la concentrazione di *Campylobacter* è bassa (Hermosilla, 2004; Johannessen et al., 2007).

Le macellazioni programmata e quella logistica sono difficili da combinare in modo ottimale: per la macellazione logistica i test devono essere eseguiti diversi giorni prima della macellazione, e di

conseguenza alcuni lotti possono diventare positivi dopo l'analisi, mentre per la macellazione programmata i campioni devono essere prelevati il più vicino possibile alla macellazione.

#### 5.3.4 Decontaminazione

La decontaminazione mira a ridurre sia la prevalenza che il numero di microrganismi sulle carcasse e può essere ottenuta tramite trattamento fisico o chimico.

Numerosi sono i sistemi chimici per la decontaminazione di cute e carcasse (acidi organici, perossido di idrogeno, fosfato trisodico, ozono ecc.) approvati dal Food Safety and Inspection Service (FSIS) (2002) e che vengono comunemente impiegati nei Paesi extraeuropei. Tuttavia, nessuna sostanza chimica per i trattamenti di decontaminazione è attualmente autorizzata nella UE, mentre trattamenti fisici come il congelamento e il trattamento termico sono applicati in alcuni paesi del Nord Europa (Georgsson et al., 2006a; Hofshagen e Kruse, 2005; Rosenquist et al., 2009).

Tra i trattamenti che consentono di preservare inalterato l'aspetto esterno del prodotto alimentare, l'unico in grado di agire anche all'interno del tessuto muscolare e non limitarsi alla superficie è l'irradiazione (EFSA, 2011).

I trattamenti di decontaminazione fisica si basano principalmente su processi che aumentano la temperatura delle carcasse o delle porzioni di carcasse, come pastorizzazione e sterilizzazione, o che la diminuiscano, con conseguente riduzione/blocco dell'attività microbica ed enzimatica (EFSA, 2011).

La pastorizzazione si divide in rapida (utilizza temperature tra i 72°C e 85°C per tempi che vanno da qualche minuto a pochi secondi) e lenta (temperature superiori o uguali a 63°C per 30 minuti). Anche quest'ultima è sufficiente per eliminare *Campylobacter*. La sterilizzazione consiste nel riscaldamento dell'alimento a temperature superiori di 100°C per tempi stabiliti. In realtà, sia la pastorizzazione che la sterilizzazione non vengono utilizzate per le carni di pollo, ma per alimenti liquidi, come per esempio il latte, anche perché comportano effetti negativi nell'alimento, come la denaturazione delle proteine e distruzione delle vitamine e variazione dei parametri organolettici. Diversi studi hanno dimostrato che anche con la semplice cottura delle carni si ottiene una riduzione della carica microbica. Ad esempio, nel 2010 Sampers et al. hanno dimostrato che, durante la cottura, la carica di *Campylobacter* in hamburger di pollo diminuisce

dopo 2 minuti se la temperatura interna raggiunge circa 38°C e dopo 4 minuti scende al di sotto dei limiti di rilevabilità (< 10 UFC/g) se la temperatura interna raggiunge circa 57,5° C.

Il trattamento con vapore a pressione atmosferica è un'opzione interessante perché non determina la produzione di grandi volumi di acqua di lavorazione. Sia i trattamenti a vapore che quelli ad acqua calda riducono il numero di *Campylobacter* di 1,5-2 log<sub>10</sub> di CFU sulla superficie, a differenza dei *Campylobacter* eventualmente presenti all'interno della massa carnea. L'esterno di carcasse trattate con entrambi i metodi viene modificato, in particolare la cute diventa più fragile e ogni muscolo esposto cambia colore. Tuttavia, non varia l'aspetto delle carni una volta cucinate (EFSA, 2011).

I trattamenti termici che sfruttano le basse temperature sono rappresentati dalla refrigerazione (tra 0°C e +4°C), congelamento e surgelazione (almeno -18°C). Queste ultime assicurano al consumatore la mancata attività dei batteri presenti nell'alimento, compreso *Campylobacter*, ma solo se viene mantenuta la temperatura inferiore a -18°C lungo tutta la filiera alimentare fino al momento del consumo (Sampers et al., 2010).

L'irradiazione, invece, lascia l'aspetto della carne sostanzialmente invariato e utilizza raggi gamma da isotopi come il cobalto-60, o raggi X o elettroni con spettri di energia appropriati (EFSA, 2011).

I raggi gamma e i raggi X sono più penetranti e potrebbero essere usati per trattare carcasse intere, mentre gli elettroni sono meno penetranti, quindi potrebbero essere utilizzati sulle porzioni di carcasse. Un vantaggio dei raggi X o degli elettroni è che possono essere generati usando macchine relativamente economiche, accese o spente a seconda delle necessità e installabili nella maggior parte dei macelli. Un altro vantaggio dell'irradiazione è che inattiva *Campylobacter* all'interno degli alimenti, oltre che all'esterno, e può essere utilizzata su prodotti preconfezionati e/o congelati o refrigerati. L'irradiazione del prodotto preconfezionato impedirebbe la ricontaminazione post-processo (EFSA, 2011).

#### 5.4 Strategie di prevenzione per l'uomo

Numerose indagini su casi di infezione con batteri zoonotici quali *C. jejuni* e *C. coli* hanno dimostrato che il consumo e la manipolazione domestica di pollo crudo e la contaminazione crociata con altri alimenti rappresentano il principale fattore di rischio per l'infezione e la

malattia nell'uomo (Allerberger et al.,2003; Brouwer et al.,1979; Friedman et al.,2004; Kapperud et al.,2003; Lindmark et al.,2004).

La contaminazione può essere diretta, dalla carne cruda ai prodotti che non vengono cotti (ad esempio verdure), o indiretta, attraverso le superfici di lavoro, le mani o gli utensili. La più importante fonte di contaminazione è rappresentata dal trasferimento di batteri da superfici di taglio non lavate e sanificata al prodotto pronto al consumo (EFSA, 2011).

Alcuni fattori possono influenzare il numero di *Campylobacter* trasferiti, come le goccioline di fluidi, l'area di contatto tra il pollo crudo e la superficie di taglio e il tempo di contatto. È importante notare come le superfici interne ed esterne delle confezioni che avvolgono il pollo possano essere un potenziale veicolo, sia nei punti vendita che nelle cucine domestiche. A tale proposito, sono stati isolati *Campylobacter* dal 3% di confezioni esterne e dal 34% di confezioni interne (Harrison et al. 2001). Precisamente, su 809 confezioni di pollo esaminate il 3% era positivo sulle superfici esterne, mentre da 129 confezioni di tacchino la contaminazione era dello 0,8%. La confezione esterna delle carni crude, quindi, può rappresentare un veicolo di contaminazione crociata da *Campylobacter* e altri patogeni come *Salmonella* o *E. coli*, sia nei punti di vendita al dettaglio, sia nelle case dei consumatori (Burgess et al., 2005).

Per valutare l'esposizione del consumatore durante la preparazione e il consumo di alimenti, alcuni autori hanno campionato le parti superficiali e le parti interne del pollo, riscontrando un basso numero di batteri nel muscolo, rispetto ad una concentrazione più alta nei tessuti superficiali (Luber e Bartelt, 2007). Da questo studio emerge che, nell'esposizione dei consumatori a *Campylobacter*, la contaminazione crociata durante la manipolazione del pollo è più importante rispetto al consumo di carne di pollo non sufficientemente cotta. Inoltre, Luber et al. (2006) hanno utilizzato parti fresche di pollo naturalmente contaminato ed hanno simulato la manipolazione e le situazioni che di solito avvengono nelle cucine domestiche. Poiché il trattamento termico uccide qualsiasi *Campylobacter* presente sulla superficie esterna del pollo (Jacobs-Reitsma et al.,2000), l'esposizione umana dipende soprattutto dalla frequenza e dal livello di contaminazione crociata nell'ambiente dove avviene la preparazione del cibo (Cogan et al.,2002).

In cucina le principali cause che provocano la contaminazione sono rappresentate dal contatto diretto con le mani non lavate, con le quali si è manipolato il prodotto crudo (Rusin et al.,2002), e gli alimenti pronti per il consumo, come per esempio il pane, e dal riutilizzo di piastre o taglieri

utilizzati precedentemente per il pollo crudo per un prodotto pronto al consumo. La prevalenza dell'uno o dell'altra causa dipenderanno dal comportamento assunto dal consumatore in cucina.

Per ridurre l'esposizione a *Campylobacter* è quindi necessario rafforzare l'educazione dei consumatori e del personale coinvolto nella manipolazione e preparazione degli alimenti (EFSA, 2005).

A tal proposito, l'UFSP (Ufficio Federale della Sanità Pubblica svizzero) rammenta che le raccomandazioni igieniche per evitare la cross-contaminazione con *Campylobacter* e altri agenti patogeni e la conseguente infezione sono:

- lavare accuratamente mani e unghie con sapone prima e dopo aver toccato carne cruda;
- tenere lontani gli animali domestici dagli alimenti e non accarezzarli mentre si cucina;
- dopo l'acquisto, mettere al fresco o surgelare il più rapidamente possibile la carne cruda e conservarla in modo che non possa colare liquido dall'imballaggio e contaminando altri alimenti;
- prima di cucinare, lasciare la carne cruda soltanto per breve tempo a temperatura ambiente;
- prima di cucinare la carne cruda, eliminare il liquido creatosi in seguito allo scongelamento;
- lavorare la carne cruda sempre su una superficie (tagliere) separata; pulire accuratamente con acqua calda e detersivo il tagliere e il coltello dopo ogni operazione;
- rimuovere il liquido della carne cruda con uno strofinaccio usa e getta o con carta da cucina;
- la carne cruda non deve entrare in contatto con pietanze pronte per il consumo;
- cuocere sempre completamente la carne, in particolare quella di pollame, affinché non vi siano più parti rosee e la carne si stacchi facilmente dalle ossa;
- cambiare regolarmente gli strofinacci e gli asciugamani e lavarli a temperatura elevata (almeno 60°C).

Mattick et al. (2003) hanno studiato la sopravvivenza di *Campylobacter* nei residui di cibo presenti sui piatti prima del lavaggio a secco condotto per 72h a 21°C. Hanno concluso che i piatti sporchi dovrebbero essere lasciati all'aria prima del lavaggio, vista la sensibilità del batterio all'asciugatura; hanno inoltre raccomandato di eseguire il lavaggio e il risciacquo alla temperatura più elevata possibile. È stata riscontrata un'effettiva riduzione di *Campylobacter* nelle superfici contaminate combinando il lavaggio a base di detersivi ed il risciacquo a temperature elevate (Cogan et al., 1999).

Stern et al. (2003) hanno studiato la correlazione tra prevalenza di *Campylobacter* sulle carni manipolate in ambiente domestico e i casi di campilobatteriosi. Da questo studio eseguito in Islanda è emerso che sebbene le campagne informative televisive, radiofoniche e cartacee abbiano contribuito alla riduzione delle infezioni, è difficile cambiare comportamenti ed abitudini ormai radicate nella popolazione.

## 5.5 Criteri microbiologici

Il Regolamento (UE) 2017/1495 della Commissione del 23 agosto 2017 modifica il Regolamento (CE) n. 2073/2005 per quanto riguarda il criterio relativo a *Campylobacter* nelle carcasse di polli da carne.

Il Regolamento (CE) n. 2073/2005 della Commissione sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari stabilisce i criteri per taluni microrganismi e le norme che gli operatori del settore alimentare devono rispettare in merito ai requisiti generali e specifici in materia d'igiene di cui all'articolo 4 del Regolamento (CE) n. 853/2004.

In particolare, il Regolamento (CE) n. 2073/2005 stabilisce dei criteri di igiene di processo che fissano valori indicativi di contaminazione al di sopra dei quali sono necessarie misure correttive, volte a mantenere l'igiene del processo di produzione in ottemperanza alla legislazione in materia di prodotti alimentari.

Nel 2010 l'EFSA ha pubblicato un'analisi sulla prevalenza di *Campylobacter* nelle partite e nelle carcasse di polli da carne (EFSA, 2010). L'indagine di riferimento è stata condotta nel 2008 nei macelli al fine di ottenere cifre comparabili sulla prevalenza e sul livello di contaminazione dei polli da carne nell'Unione Europea. L'EFSA ha concluso che in media il 75,8 % delle carcasse di polli da carne erano contaminate, con variazioni significative tra gli Stati membri e i macelli.

Secondo il parere scientifico pubblicato dall'EFSA nel 2010 sul rischio di campilobatteriosi umana dovuta al consumo di carne di broiler, la manipolazione, preparazione e consumo di carne di pollo sono all'origine del 20-30 % dei casi, mentre il 50-80 % è attribuito al pollo in relazione al ruolo di serbatoio.

Il parere scientifico pubblicato dall'EFSA nel 2011 sulle possibilità di controllo di *Campylobacter* nella filiera produttiva delle carni di pollo proponeva una serie di opzioni sia a livello di azienda sia di macello, compresa l'introduzione di un criterio di igiene del processo per *Campylobacter*, e

formulava una stima del loro impatto sulla riduzione del numero di casi nell'uomo. L'EFSA riteneva che sarebbe possibile ridurre di oltre il 50 % il rischio per la salute pubblica derivante dal consumo di carne di pollo se le carcasse rispettassero il limite di 1000 UFC/g e sottolineava la presenza di una significativa differenza nei livelli di contaminazione tra i campioni di pelle di collo, che presentano una carica microbica più elevata, e quelli di pelle del petto.

Nel 2012 l'EFSA ha definito *Campylobacter* altamente rilevante per la salute pubblica, a motivo della sua diffusione, EFSA e raccomandava che i vigenti metodi di ispezione venissero adeguati attraverso l'introduzione di un criterio di igiene di processo per le carcasse di polli da carne.

Dopo le pubblicazioni di EFSA, l'articolo 1 del Regolamento (UE) 2017/1495, modificando l'allegato 1 del regolamento (CE) n. 2073/2005, inserisce tra i criteri microbiologici e le norme di attuazione che gli operatori del settore alimentare devono rispettare in merito ai requisiti generali e specifici in materia d'igiene anche quelli relativi a *Campylobacter*.

Al fine di ridurre gli oneri amministrativi a carico degli OSA, il programma di campionamento prevede che vengano usati anche per la ricerca di *Campylobacter* gli stessi campioni di pelle del collo usati per verificare la conformità al criterio di igiene del processo stabilito per la *Salmonella*.

Se le prove sono condotte dallo stesso laboratorio, in ogni sessione di campionamento sono prelevati casualmente campioni di pelle di collo da almeno 15 carcasse di pollame dopo raffreddamento. Prima di essere esaminati, i campioni di pelle di collo prelevati da almeno tre carcasse di pollame provenienti dallo stesso branco di origine sono aggregati in un unico campione di 26 g. I campioni di pelle di collo formano così 5 campioni finali di 26 g (sono necessari 26 g per la ricerca in parallelo di *Salmonella* e *Campylobacter* da un unico campione).

Se invece, le prove per *Salmonella* e *Campylobacter* sono condotte in due laboratori diversi, in ogni sessione di campionamento sono prelevati casualmente campioni di pelle di collo da almeno 20 carcasse di pollame dopo raffreddamento. Prima di essere esaminati, i campioni di pelle di collo prelevati da almeno quattro carcasse di pollame provenienti dallo stesso branco di origine sono aggregati in un solo campione di 35 g. I campioni di pelle di collo formano così 5 campioni finali di 35 g che sono a loro volta divisi in modo da ottenere 5 campioni finali di 25 g (per la ricerca di *Salmonella*) e 5 campioni finali di 10 g (per la ricerca di *Campylobacter*).

In entrambe le evenienze, al fine di garantirne l'integrità, dopo il prelievo i campioni sono conservati e trasportati al laboratorio a una temperatura non inferiore a 1 °C e non superiore a 8

°C e il tempo tra il campionamento e le analisi per la ricerca di *Campylobacter* è inferiore a 48 ore. I campioni che sono stati conservati ad una temperatura di 0 °C non vengono utilizzati per controllare la conformità al criterio relativo a *Campylobacter*.

I campioni sono utilizzati per verificare la conformità al criterio di igiene del processo per *Campylobacter spp.* in base alle modificazioni apportate dal Regolamento (UE) 2017/1495 all'allegato I del regolamento (CE) n. 2073/2005.

L'allegato I del regolamento (CE) n. 2073/2005 è stato modificato aggiungendo la riga 2.1.9 (tab. 6) alla tabella della sezione 2.1 del capitolo 2.

Tabella 6. Criteri di igiene del processo per *Campylobacter spp.* (Reg. UE 2017/2005)

Categoria alimentare	Microrganismi	Piano di campionamento		Limiti		Metodo d'analisi di riferimento	Fase a cui si applica il criterio	Azioni in caso di risultati insoddisfacenti
		n	c	m	M			
2.1.9 Carcasse di polli da carne	<i>Campylobacter spp.</i>	50	c = 20 Dall'1.1.2020 c = 15; Dall'1.1.2025 c = 10	1 000		EN ISO 10272-2	Carcasse dopo il raffreddamento	Miglioramento delle condizioni igieniche della macellazione, revisione dei controlli del processo, dell'origine degli animali e delle misure di biosicurezza nelle aziende di origine

Come evidenziato in Tabella 6, il numero di unità campionarie è pari a 50 (c), di queste il numero di campioni che può presentare un valore superiore al valore limite di 1000 UFC/g è pari a 15 unità campionarie. Dal 01.01.2025, invece, le unità campionarie che potranno superare il valore limite si ridurranno a 10. La diminuzione del numero di unità campionarie che possono superare

il valore limite è indice di un piano di campionamento che diventerà gradualmente più severo proprio in considerazione della vasta diffusione del patogeno.

Nella tabella sono descritti anche il metodo di analisi di riferimento, la fase di applicazione del criterio e i provvedimenti che devono essere presi dall'OSA nel caso in cui l'interpretazione dei risultati delle prove sia insoddisfacente.

Nel caso del campionamento di carcasse di pollame per la ricerca del *Campylobacter*, la frequenza può essere ridotta a una volta ogni due settimane qualora si ottengano risultati soddisfacenti per 52 settimane consecutive. La frequenza del campionamento può essere inoltre ridotta, previa autorizzazione dell'autorità competente, se vi è un programma di controllo nazionale o regionale ufficiale o ufficialmente riconosciuto per *Campylobacter* che includa metodi di campionamento e di prova equivalenti a quelli richiesti per verificare la conformità al criterio di igiene del processo definiti nel Regolamento (UE) 2017/1495. Se il programma di controllo prevede un livello basso di contaminazione nei lotti, la frequenza del campionamento può essere ulteriormente ridotta se tale livello di contaminazione è raggiunto nell'arco di 52 settimane nelle aziende di origine dei polli da carne acquistati dal macello. Se il programma di controllo mostra risultati soddisfacenti durante un periodo dell'anno specifico, la frequenza della ricerca di *Campylobacter* può altresì essere adattata alle variazioni stagionali previa autorizzazione dell'autorità competente.

Tuttavia, se l'analisi del rischio lo giustifica e di conseguenza l'autorità competente lo autorizza, il Regolamento CE n. 2073/2005 modificato dal Reg. (UE) 2017/1495 prevede che i macelli di piccole dimensioni possono essere esentati dal rispetto di queste frequenze di campionamento.

## 6. Definizione di alimenti a rischio secondo la normativa europea

Un passo importante nell'ambito della sicurezza alimentare è stato compiuto nel 2002 dalla Comunità Europea con l'emanazione del Regolamento (CE) n°178/2002. In esso vengono stabiliti i principi e i requisiti generali della legislazione alimentare riguardanti le fasi di produzione, trasformazione e distribuzione degli alimenti e dei mangimi, nonché le procedure necessarie alla sicurezza alimentare. È con questo documento che viene altresì istituita "l'Autorità europea per la sicurezza alimentare" (EFSA). Tale ente ha il compito specifico di offrire ai paesi membri consulenza e assistenza scientifico-tecnica alla stesura della normativa e alla definizione delle politiche nei settori dell'attività umana che incidono in modo diretto o indiretto sulla sicurezza degli alimenti e dei mangimi. È evidente quindi il ruolo fondamentale che l'EFSA gioca nell'innalzare il livello di tutela della salute umana e dei diritti dei consumatori.

Proprio a partire dal Regolamento (CE) n. 178/2002 si può definire alimento (o «prodotto alimentare», o «derrata alimentare») qualsiasi sostanza o prodotto trasformato, parzialmente trasformato o non trasformato, destinato ad essere ingerito, o che possa essere ingerito, da esseri umani (Art.2 del Regolamento). Sempre in questo testo normativo si trovano i fondamenti per prendere decisioni in ambito di sicurezza alimentare attraverso l'analisi del rischio (Art. 6 Regolamento).

Il rischio è calcolato in funzione della probabilità e della gravità di un effetto nocivo per la salute, conseguente alla presenza di un "pericolo". Con il termine "pericolo" si intende un agente biologico, chimico o fisico contenuto in un alimento o mangime, oppure la condizione in cui un alimento o un mangime si trova, in grado anch'esso di provocare un effetto nocivo sulla salute.

L'analisi del rischio prende in considerazione tre componenti interconnesse tra loro: la valutazione, la gestione e la comunicazione del rischio.

Nella valutazione del rischio, gli alimenti sono considerati a rischio (Art. 14: Requisiti di sicurezza degli alimenti) se dannosi per la salute e/o se sono inadatti al consumo umano. Gli alimenti a rischio (dannosi o inadatti al consumo umano) non possono essere immessi sul mercato. Per gli alimenti dannosi non si considerano solo gli effetti immediati, a breve, o a lungo termine, ma anche gli effetti cumulativi nel tempo sul soggetto e sui suoi discendenti. Inoltre, non bisogna trascurare la particolare sensibilità che diverse categorie di consumatori possono manifestare verso specifici alimenti.

Per determinare se un alimento sia dannoso occorre infine prendere in considerazione le condizioni d'uso normali dell'alimento da parte del consumatore in ciascuna fase della produzione, della trasformazione e della distribuzione, nonché le informazioni messe a disposizione del consumatore, comprese le informazioni riportate sull'etichetta o altre informazioni generalmente accessibili al consumatore sul modo di evitare specifici effetti nocivi per la salute provocati da un alimento o categoria di alimenti.

Un alimento d'altro canto è considerato inadatto al consumo umano se è inaccettabile perché contaminato da materiale estraneo o interessato da fenomeni di putrefazione, deterioramento o decomposizione.

Se un alimento a rischio fa parte di una partita di alimenti della stessa classe e descrizione, si presume che tutti gli alimenti contenuti in quella partita siano a rischio, a meno che, a seguito di indagini approfondite, risulti infondato ritenere che il resto della partita sia a rischio.

Per considerare sicuro un alimento in assenza di specifiche disposizioni comunitarie, è sufficiente che sia conforme alle norme della legislazione alimentare dello stato membro sul cui territorio viene commercializzato, purché tali norme rispettino i principi del Regolamento espresse dall'articolo 14.

## 6.1 Rintracciabilità degli alimenti

L'OSA è la persona fisica o giuridica responsabile nel garantire il rispetto delle disposizioni della legislazione alimentare nell'impresa alimentare posta sotto il suo controllo.

Gli OSA, secondo l'articolo 18 del Regolamento (CE) n. 178/2002, devono essere in grado di individuare chi abbia fornito loro un alimento, un animale destinato alla produzione alimentare o qualsiasi sostanza destinata o atta a entrare a far parte di un alimento e le imprese alle quali hanno fornito i propri prodotti. A tal fine gli OSA devono disporre di sistemi e di procedure che consentano di mettere a disposizione delle autorità competenti, che le richiedano, le informazioni al riguardo.

In base a questo è disposta in tutte le fasi della produzione, della trasformazione e della distribuzione la rintracciabilità degli alimenti, degli animali destinati alla produzione alimentare e di qualsiasi altra sostanza destinata o atta a entrare a far parte di un alimento.

Gli alimenti o i mangimi che sono immessi sul mercato della UE o che probabilmente lo saranno devono essere adeguatamente etichettati, secondo il Reg. (CE) n. 1169/2011, o identificati per agevolare la rintracciabilità, mediante documentazione o informazioni pertinenti secondo i requisiti previsti in materia da disposizioni più specifiche.

## 6.2 Ritiro e richiamo

Nell'articolo 19 del Regolamento (CE) n. 178/2002 vengono definiti gli obblighi degli operatori del settore alimentare relativi agli alimenti. Gli OSA collaborano con le autorità competenti riguardo ai provvedimenti volti ad evitare o ridurre i rischi provocati da un alimento che forniscono o hanno fornito. Qualora un OSA ritenga, o abbia motivo di ritenere, che un alimento importato, prodotto, trasformato, lavorato o distribuito non sia conforme ai requisiti di sicurezza degli alimenti (alimento dannoso per la salute umana o inadatto al consumo), e l'alimento non si trovi più sotto il controllo immediato di tale operatore, esso deve avviare immediatamente procedure per ritirarlo e informarne le autorità competenti.

Se il prodotto può essere arrivato al consumatore, l'operatore informa i consumatori, in maniera efficace e accurata, del motivo del ritiro e, se necessario, richiama i prodotti già forniti ai consumatori quando altre misure siano insufficienti a conseguire un livello elevato di tutela della salute.

## 7. Conclusioni

Dalla valutazione dell'epidemiologia della campilobatteriosi è evidente che il problema sanitario ha forte impatto sulla salute pubblica. Mentre gli sforzi globali per controllare la trasmissione di altri patogeni enterici sono stati efficaci nel ridurre l'incidenza, come nel caso di *Salmonella*, le infezioni umane da *Campylobacter* sono andate aumentando nell'ultimo decennio nella maggior parte dei paesi sviluppati (Facciola et al., 2017). Anche nella UE, il numero di ospedalizzazioni per campilobatteriosi è più elevato rispetto a tutte le altre infezioni di origine alimentare.

In particolare *C. jejuni* e *C. coli* sono le due specie che più frequentemente causano malattia nell'uomo e la carne di pollo è considerata la principale fonte del patogeno per l'uomo (EFSA, 2010). L'EFSA, nel 2011 ha pubblicato un parere su "*Campylobacter* in broiler meat production: control options and performance objectives and/or targets at different stages of the food chain" suggerendo all'epoca l'introduzione di un criterio microbiologico per *Campylobacter* sulle carcasse di polli da carne al macello. Con tale criterio microbiologico, si stimava che il rischio per la salute pubblica potesse essere ridotto di più del 50% rispettando il limite critico di 1.000 CFU/g sulla cute del collo dei polli dopo la macellazione. EFSA ha insistito anche l'anno successivo, ritenendo che il problema *Campylobacter* dovesse essere affrontato come priorità assoluta per la tutela della salute pubblica.

La miglior strategia per ridurre i casi di campilobatteriosi umana è sicuramente legata alla diminuzione del livello di colonizzazione intestinale da *Campylobacter* soprattutto nel pollo da carne, nel quale il microrganismo ha ampia diffusione, comportandosi per lo più da commensale. Le diverse misure attuate a livello degli allevamenti, durante il trasporto al macello e le fasi di macellazione riescono solo in parte a diminuire la prevalenza della contaminazione delle carni di pollo. Inoltre, gran parte delle infezioni avvengono anche per le scarse conoscenze del consumatore in merito a questo pericolo biologico e l'inosservanza, talora involontaria, di basilari norme igieniche che ostacolerebbero la trasmissione del patogeno all'uomo.

Lo studio di una strategia che miri alla tutela della salute pubblica deve necessariamente tenere conto di tutte le variabili che influenzano la diffusione di un pericolo, insieme ad una valutazione costi/benefici degli interventi ipotizzabili. Se da una parte il controllo dello stato dell'infezione in allevamento avrebbe il maggiore impatto sulla riduzione della prevalenza dell'infezione nell'uomo, è anche vero che un piano di monitoraggio avrebbe costi elevati. D'altra parte la sola responsabilizzazione del gestore del macello garantisce solo in parte la commercializzazione di

carni sicure sotto il profilo microbiologico. In un contesto così complesso, che comprende anche il consumatore finale, nel caso un paese non potesse sostenere i costi di un piano di monitoraggio a livello della produzione primaria, solo un'integrazione di strategie diverse può portare a risultati che tutelino la salute umana.

## Bibliografia

- Acik M.N., Cetinkaya B. (2006). Heterogeneity of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* strains from healthy sheep. *Vet Microbiol.* 115: 370-375
- Alfredson, D. A., and Korolik, V. (2007). Antibiotic resistance and resistance mechanisms in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* 277, 123–132. doi: 10.1111/j.1574-6968.2007.00935.x
- Allen V.M., Weaver, H., Ridley, A.M. Harris, J.A., Sharma, M. Emery, J., Sparks, N., Lewis,, Edge S.(2008a). Sources and spread of thermophilic *Campylobacter* spp. during partial depopulation of broiler chicken flocks. *J Food Prot*, 71, 264–270.
- Allen, V.M., Whyte, R.T., Burton, C.H., Harris, J.A., Lovell, R.D.L., Atterbury, R.J. and Tinker, D.B.(2008b) Effect of ultrasonic treatment during cleaning on the microbiological condition of poultry transport crates. *Br Poult Sci*, 49, 423–428.
- Allerberger, F., N. Al-Jazrawi, P. Kreidl, M. P. Dierich, G. Feierl, I. Hein, and M. Wagner (2003). Barbequed chicken causing a multi-state outbreak of *Campylobacter jejuni* enteritis. *Infection*, 31:19-23.
- Allos B. M. (1997): Association between *Campylobacter* infection and Guillain-Barré syndrome. *J. Infect. Dis.* 176:S125–S128
- Anandan C, Khuder SA, Koffman BM (2017). Prevalence of autonomic dysfunction in hospitalized patients with Guillain-Barré syndrome. *Muscle Nerve* 2017; 56: 331–333.
- Bae W., Kaya K.N., Hancock D.D., Call D.R., Park Y.H., Besser T.E. 2005. Prevalence and antimicrobial resistance of thermophilic *Campylobacter* spp. from cattle farms in Washington State. *Appl Environ Microbiol*; 71: 169-74
- Bailey JS, Stern NJ, Fedorka-Cray P, Craven SE, Cox NA, Cosby DE, Ladely S and Musgrove MT, 2001. Sources and movement of Salmonella through integrated poultry operations: A multistate epidemiological investigation. *Journal of Food Protection*, 64, 1690-97
- Bardon J., Kolar M., Cekanova L., Hejnar P., Koukalova D. (2008). Prevalence of *Campylobacter jejuni* and its resistance to antibiotics in poultry in the Czech Republic. *Zoonoses and Public Health.*; 56: 111- 116

- **Bates C., Hiatt K.L., Stern N.J. (2004).** Relationship of *Campylobacter* isolated from poultry and from darkling beetles in New Zealand. *Avian Dis*; 48: 138-47
- **Beery J.T, Hugdahl M.B, Doyle M.P. (1988).** Colonization of gastrointestinal tracts of chicks by *Campylobacter jejuni*. *Appl Environ Microbiol.* 54: 2365-2370
- **Berndtson E, Danielsson-Tham ML and Engvall A, 1996.** *Campylobacter* incidence on a chicken farm and the spread of *Campylobacter* during the slaughter process. *Int J Food Microbiol*, 32, 35-47.
- **Berrang ME, Northcutt JK, Fletcher DL and Cox NA, 2003.** Role of dump cage fecal contamination in the transfer of *Campylobacter* to carcasses of previously negative broilers. *Journal of Applied Poultry Research*, 12, 190-95.
- **Bilgili SF, 2002.** Slaughter quality as influenced by feed withdrawal. *Worlds Poultry Science Journal*, 58, 123-30.
- **Blanco-Lizarazo, C. M., Sotelo-Díaz, I., Arjona-Roman, J. L., Llorente-Bousquets, A., and Miranda-Ruvalcaba, R. (2018).** Effect of starter culture and low concentrations of sodium nitrite on fatty acids, color, and *Escherichia coli* behavior during salami processing. *Int. J. Food Sci.* 2018, 5934305. doi: 10.1155/2018/5934305
- **Blaser M.J., Taylor D.N., Feldam R.A. (1984).** Epidemiology of *Campylobacter* infections. In: Butzler J.P. (Eds), *Campylobacter* Infection in Man and Animals, pp 143-161. CRC Press Boca Raton, FL
- **Boysen L and Rosenquist H, 2009.** Reduction of thermotolerant *Campylobacter* species on broiler carcasses following physical decontamination at slaughter. *Journal of Food Protection*, 72, 497- 502.
- **Bouwknegt M, van de Giessen AW, Dam-Deisz WD, Havelaar AH, Nagelkerke NJ and Henken AM, 2004.** Risk factors for the presence of *Campylobacter* spp. in Dutch broiler flocks. *Prev Vet Med*, 62, 35-49.
- **Bronowski C., James C. E., Winstanley C. (2014):** Role of environmental survival in transmission of *Campylobacter jejuni*, *FEMS Microbiology Letters*, Volume 356, Issue 1, July 2014, Pages 8–19

- **Brouwer, R., M. J. A. Mertens, T. H. Siem, and J. Katchaki.**(1979). An explosive outbreak of *Campylobacter enteritis* in soldiers. *Antonie Leeuwenhoek J. Microbiol*, 45:517-519.
- **Bull S.A., Allen V.M., Domingue G., Jorgensen J.A., Frost R., Ure R., Whyte D., Tinker J.E., Corry J., Gillard-King J,** (2006): Sources of *Campylobacter* spp. colonizing housed broiler flocks during rearing. *Appl Environ Microbiol* 2006;72:645-52
- **Burgess F, Little CL, Allen G, Williamson K, Mitchell RT.**(2005) Prevalence of *Campylobacter*, *Salmonella*, and *Escherichia coli* on the external packaging of raw meat. *J Food Prot.*, 68(3):469-475.
- **Byrne C.M., Clyne M., Bourke B. (2007).** *Campylobacter jejuni* adhere to and invade chicken intestinal epithelial cells in vitro. *Microbiol.* 153: 561- 569
- **Chaban B, Ngeleka M, Hill J. (2010)** Detection and quantification of 14 *Campylobacter* species in pet dogs reveals an increase in species richness in feces of diarrheic animals. *BMC Microbiol* 2010;10:73.
- **Chintoan-Uta C., Cassady-Cain R. L., Al-Haideri H., Watson E., Kelly D. J., Smith D. G., Sparks NH, Kaiser P, Stevens MP** 2015. Superoxide dismutase SodB is a protective antigen against *Campylobacter jejuni* colonisation in chickens. *Vaccine*, 33:6206–6211.
- **Cogan TA, Bloomfield SF, Humphrey TJ. (1999)** The effectiveness of hygiene procedures for prevention of cross-contamination from chicken carcasses in the domestic kitchen. *Lett Appl Microbiol.*,29(5):354-358.
- **Cogan, T. A., J. Slader, S. F. Bloomfield, and T. J. Humphrey (2002).** Achieving hygiene in the domestic kitchen: the effectiveness of commonly used cleaning procedures. *J. Appl. Microbiol.*,92:885-892.
- **Colavita G., Armani A., Avellini P., Balzan S, Bonardi F., Bozzo G., Brindani F., Cantoni C, Castigliengo L, Cenci Goga BT, Conter M, Cosseddu A., D’Ascenzi C., De Santis E. Ghidini S., Giaccone V., Giuffrida A, Guidi A, Ianieri A, Loschi AR, Novelli E., Panebianco A., Rea S., Rosmini R., Salsi A., Scarano C., Serraino A., Sorcini G, Stocchi R., Tantillo GM, Trevisani M., Vergara A., Zanardi E.**(2012)-Igiene e tecnologie degli alimenti di origine animale. *Point veterinarie Italie*, Milano

- Corry JEL, Allen VM, Hudson WR, Breslin MF and Davies RH, 2002. Sources of Salmonella on broiler carcasses during transportation and processing: Modes of contamination and methods of control. *Journal of Applied Microbiology*, 92, 424-32.
- Costa D., Iraola G., (2019) - Pathogenomics of Emerging *Campylobacter* Species, *Clinical Microbiology Reviews*, American Society for Microbiology
- Cox JM and Pavic A, 2010. Advances in enteropathogen control in poultry production. *Journal of Applied Microbiology*, 108, 745-55.
- Crawshaw T. (2019): A review of the novel thermophilic *Campylobacter*, *Campylobacter hepaticus*, a pathogen of poultry. *Transbound Emerg Dis.* 2019;66:1481-92.
- Damborg P, Olsen KEP, Nielson EM, Guardabassi L. (2004): Occurrence of *Campylobacter jejuni* in pets living with human patients infected with *C. jejuni*. *J Clin Microbiol* 2004;42:1363
- Dasti J I, Tareen A M, Lugert R Zautner AE, Gross U (2010): “*Campylobacter jejuni*: a brief overview on pathogenicity-associated factors and disease-mediating mechanisms”. *Int J Med Microbiol*300:205-211
- De Cesare A, Sheldon BW, Smith KS, Jaykus L. (2003): Survival and persistence of *Campylobacter* and *Salmonella* species under various organic loads on food contact surfaces. *J Food Prot* 2003;66(9):1587-94
- Debruyne L, Gevers D, Vandamme P. (2008); Taxonomy of the Family Campylobacteraceae. In: Nachamkin I, Szymanski C, Blaser M eds. *Campylobacter*, Third Edition. Washington, DC: ASM Press 2008, pp 3-25.
- Dhillon A.S., Shuvaprasad H.L., Schaberg D., Wier F., Weber S., Bandli D. (2006). *Campylobacter jejuni* infection in broiler chickens. *Avian Dis.* 50: 55-58
- Domingues AR, Pires SM, Halasa T, Hald T. (2012): Source attribution of human Campylobacteriosis using a meta-analysis of case-control studies of sporadic infections. *Epidemiol Infect.*,140(6):970–981.
- Doorduyn Y., Van Pelt W., Siezen C.L., Van Der Horst F., Van Duynhoven Y.T., Hoebee B., Janssen R. (2008). Novel insight in the association between salmonellosis or Campylobacteriosis and chronic illness, and the role of host genetics in susceptibility to these disease. *Epidemiol Infect.* 136: 1225-1234

- **EFSA**, 2005. The community summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and antimicrobial resistance in the European Union in 2004. The EFSA Journal, 310. ISBN 92-9199- 016-7.
- **EFSA Journal**, 2010; Analysis of the baseline survey on the prevalence of *Campylobacter* in broiler batches e of *Campylobacter* e *Salmonella* on broiler carcasses in the EU, 200. 8(03):1503
- **EFSA Journal**, 2010: Scientific Opinion on Quantification of the risk posed by broiler meat to human *Campylobacteriosis* in the EU. 8(1): 1437.
- **EFSA**. 2011. **Scientific report of EFSA and ECDC**. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2009. EFSA J. 9: 2090-2468 38.
- **EFSA**. 2011. **Scientific report of EFSA and ECDC**. The European Union Summary Report on antimicrobial resistance and indicator bacteria from humans, animals and food in the European Union in 2009. EFSA J. 9: 2154-2475
- **EFSA Journal** 2011. Scientific Opinion on *Campylobacter* in broiler meat production: control options and performance objectives and/or targets at different stages of the food chain; 9(4): 2105.
- **EFSA Journal**, 2012; Scientific Opinion on the public health hazards to be covered by inspection of meat (poultry). 2012;10(6):2741
- **EFSA and ECDC (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control)**, 2021. The European Union One Health 2019 Zoonoses Report. EFSA Journal 2021;19(2):6406, 286 pp. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6406>
- **El-Shibiny A, Scott A, Timms A, Metawea Y, Connerton P and Connerton I**, 2009. Application of a group II *Campylobacter* bacteriophage to reduce strains of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* colonizing broiler chickens. Journal of Food Protection, 72, 733-40.
- **Evans SJ and Sayers AR**, 2000. A longitudinal study of *Campylobacter* infection of broiler flocks in Great Britain. Prev Vet Med, 46, 209-23.

- **Facciola A., R. Riso, E. Avventuroso, G. Visalli, S.A. Delia, P. Laganà (2017):** *Campylobacter*: from microbiology to prevention. Department of Biomedical and Dental Sciences and Morphofunctional Imaging, University of Messina, Italy. *J prev med hyg* 2017; 58: e79-e92
- **FAO/WHO 2009a.** Joint FAO/WHO food standards programme CODEX Committee on food hygiene. Proposed draft guidelines for control of *Campylobacter* and *Salmonella* spp. in chicken meat (N08- 2007), Coronado, USA.
- **Feng, J., Ma, L., Nie, J., Konkel, M. E., and Lu, X. (2018).** Environmental stress-induced bacterial lysis and extracellular DNA release contribute to *Campylobacter jejuni* biofilm formation. *Appl. Environ. Microbiol.* 84, e02068–e02017. doi: 10.1128/AEM.02068-17
- **Figueroa G, Troncoso M, Lopez C, Rivas P and Toro M, 2009.** Occurrence and enumeration of *Campylobacter* spp. during the processing of Chilean broilers. *Bmc Microbiology*, 9,
- **Fitzgerald C. (2015):** *Campylobacter*. *Clin Lab Med* 35 (2015) 289–298
- **Fitzgerald C. e Nachamkin I. (2011):** *Campylobacter* and *Arcobacter* In *Manual of Clinical Microbiology* editors Versalovic J et al., ASM Press, Washington DC (USA) 1:885-899.
- **Forsythe, S. J. (2010):** *The Microbiology of Safe Food*, 2nd Edition. Wiley-Blackwell, Oxford, United Kingdom, pp. 496.
- **Franco D.A., Williams C.E. (2001).** *Campylobacter jejuni*. In: Huy H.J., Pierson M.D., Gorham J.R. (Eds), *Foodborne disease handbook* 2 nd Ed, pp 83-105. Marcel Dekker Inc, New York
- **Friedman, C. R. et al. (2004):** Risk factors for sporadic *Campylobacter* infection in the United States: a case-control study in FoodNet sites. *Clin. Infect. Dis.* 38 (Suppl. 3), S285–S296 (2004).
- **FSIS/USDA 2008a.** Compliance guideline for controlling *Salmonella* and *Campylobacter* in poultry. Second edition, May 2008. [www.fsis.usda.g](http://www.fsis.usda.g)
- **García-Sánchez Lourdes, Beatriz Melero, Jordi Rovira (2018):** *Campylobacter* in the Food Chain. <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2018.04.005>
- **Garénaux A, Jugiau F, Rama F, Jonge R, Denis M, Federighi M, Ritz M. (2008):** Survival of *Campylobacter jejuni* strains from different origins under oxidative stress conditions: effect of temperature. *Curr Microbiol* 2008;56(4):293-7.).

- **Georgsson F, Porkelsson AE, Geirsdottir M, Reiersen J and Stern NJ, 2006a.** The influence of freezing and duration of storage on *Campylobacter* and indicator bacteria in broiler carcasses. *Food Microbiology*, 23, 677-83.
- **Gibbens JC, Pascoe SJ, Evans SJ, Davies RH and Sayers AR, 2001.** A trial of biosecurity as a means to control *Campylobacter* infection of broiler chickens. *Prev Vet Med*, 48, 85-99.
- **Gomes, C. N., Passaglia, J., Vilela, F. P., da Silva, F. M. P., Duque, S. S., and Falcao, J. P. (2018).** High survival rates of *Campylobacter coli* under different stress conditions suggest that more rigorous food control measures might be needed in Brazil. *Food Microbiol.* 73, 327–333. doi: 10.1016/j.fm.2018.02.014
- **Gordon L. Nichols. (2005)** Fly Transmission of *Campylobacter*. *Emerg Infect Dis* 2005;11(3):361-4.
- **Grant K. A., Belandia I. U., Dekker N., Richardson P. T., Park S. F., 1997;** Molecular Characterization of *pldA*, the Structural Gene for a Phospholipase A from *Campylobacter coli*, and Its Contribution to Cell-Associated Hemolysis. *Infection and immunity*, Apr. 1997, p. 1172–1180
- **Gruntar I., Biasizzo M., Kušar D., Pate M., Ocepek M. (2015):** *Campylobacter jejuni* contamination of broiler carcasses: Population dynamics and genetic profiles at slaughterhouse level. *Food Microbiol.*, 50:97-101.
- **Guerin MT, Martin W, Reiersen J, Berke O, McEwen SA, Bisailon JR and Lowman R, 2007.** A farmlevel study of risk factors associated with the colonization of broiler flocks with *Campylobacter* spp. in Iceland, 2001-2004. *Acta Vet Scand*, 49, 18.
- **Gundogdu O. and Brendan W. Wren (2020)** Microbe Profile: *Campylobacter jejuni* – survival instincts. *Microbiology* 2020;166:230–232
- **Hadden R.D.M. and Gregson N.A. (2001):** Guillain-Barre syndrome and *Campylobacter jejuni* infection. *Journal of Applied Microbiology* 2001, 90, 145S±154S
- **Hald B, Wedderkopp A and Madsen M, 2000.** Thermophilic *Campylobacter* spp. in Danish broiler production: A cross-sectional survey and a retrospective analysis of risk factors for occurrence in broiler flocks. *Avian Pathology*, 29, 123-31.

- **Hald B., Pedersen K., Waino M., Jorgebsen J.C., Madsen M. (2004).** Longitudinal study of the excretion patterns of thermophilic *Campylobacter* spp. in young pet dogs in Denmark. *J Clin Microbiol.* 42: 2003-2012
- **Hald B., Sommer H.M., Skovgard H. (2007).** Use of fly screens to reduce *Campylobacter* spp. introduction in broiler houses. *Emerg Infect Dis.* 13: 1951-1953
- **Hansson I, Ederoth M, Andersson L, Vagsholm I and Engvall EO, 2005.** Transmission of *Campylobacter* spp. to chickens during transport to slaughter. *Journal of Applied Microbiology*, 99, 1149-57.
- **Harrison,WA., Griffith, CJ.,Tennant, D., Peters, AC.(2001)** Incidence of *Campylobacter* and *Salmonella* isolated from retail chicken and associated packaging in South Wales. *Lett Appl Microbiol.*, 33(6):450-454.
- **Hazeleger, W. C., Janse, J. D., Koenraad, P. M., Beumer, R. R., Rombouts, F. M., and Abee, T. (1995).** Temperature-dependent membrane fatty acid and cell physiology changes in coccoid forms of *Campylobacter jejuni*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 2713–2719.
- **Helms M., Simonsen J., Molbak K. (2006).** Foodborne bacterial infection and hospitalization: a registry-based study. *Clin Infect Dis.* 42: 498-506
- **Hermosilla AM, 2004.** Transfer of contamination of *Campylobacter* spp. from positive broiler flocks to negative flocks during processing. MSc Thesis, University of Bristol, Bristol.
- **Heuvelink, A.E.,van Heerwaarden, C,Zwartkruis-Nahuis, A,Tilburg, JJ,Bos, M.H.,Heilmann, F.G.,Hofhuis, A.,Hoekstra, T.,de Boer, E. (2009)** Two outbreaks of campylobacteriosis associated with the consumption of raw cows' milk. *Int J Food Microbiol.*, 134(1-2):70-74.
- **Hiett KL, Stern NJ, Fedorka-Cray P, Cox NA, Musgrove MT and Ladely S, 2002.** Molecular subtype analyses of *Campylobacter* spp. From Arkansas and California poultry operations. *Appl Environ Microbiol*, 68, 6220-36.
- **Hofshagen M and Kruse H, 2005.** Reduction in flock prevalence of *Campylobacter* spp. in broilers in Norway after implementation of an action plan. *Journal of Food Protection*, 68, 2220-23.
- **Hofshagen M, Jonsson M and Opheim M (National Veterinary Institute), 2010.** The surveillance and control programme for *Campylobacter* spp. in broiler flocks in Norway.

Annual report 2009. Surveillance and control programmes for terrestrial and aquatic animals in Norway. Oslo, Norway.

- **Horrocks S.M., Anderson R.C., Nisbet D.J., Ricke S.C. (2009).** Incidence and ecology of *Campylobacter jejuni* and *coli* in animals. *Food Microbiol.* 15: 18-25
- **Humphrey T, O'Brien S and Madsen M, 2007.** Campylobacters as zoonotic pathogens: a food production perspective. *Int J Food Microbiol*, 117(3), 237-257.
- **Humphrey S, Chaloner G, Kemmett K, Davidson N, Williams N, Kipar A, Humphrey T, Wigley P. 2014.** *Campylobacter jejuni* is not merely a commensal in commercial broiler chickens and affects bird welfare. *mBio* 5(4):e01364-14. doi:10.1128/mBio.01364-14)
- **Indikova I., Humphrey T. J., Hilbert F. (2015).** Survival with a helping hand: Campylobacter and microbiota. *Front.Microbiol.*, 6:1266
- **Istre Gregory R., Md, Martin J. Blaser, Md, Pamela Shillam, Bs, And Richard S. Hopkins (1984):** *Campylobacter* Enteritis Associated with Undercooked Barbecued Chicken. *Am J Public Health* 1984; 74:1265-1267. **Jacobs-Reitsma, W. (2000)**Campylobacter in the food supply, p. 467-481InI. Nachamkin and M. J. Blaser (ed.), *Campylobacter*, 2nd ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C. (USA).
- **Jakopanec, I., Borgen, K, Vold L., Lund H., Forseth T., Hannula R., Nygård K .(2008)** A large waterborne outbreak of *Campylobacteriosis* in Norway: the need to focus on distribution system safety.*BMC Infect Dis.*, 8:128.
- **Jin, X., and Riedel-Kruse, I. H. (2018).** Biofilm Lithography enables highresolution cell patterning via optogenetic adhesin expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 115, 3698–3703. doi: 10.1073/pnas.1720676115
- **Jinadasa, R.N., Bloom, S.E., Weiss, R.S., Duhamel, G.E. (2011):** Cytolethal distending toxin: a conserved bacterial genotoxin that blocks cell cycle progression, leading to apoptosis of a broad range of mammalian cell lineages. *Microbiol.*, 157:1851-1875.
- **Joens, L A (2004)** *Campylobacter* and *Helicobacter*, in C L Gyles et al.:Pathogenesis of bacterial Infections in animals. 3th edition, Blackwell Publishing Professional, Iowa(USA).

- **Johannessen GS, Johnsen G, Okland M, Cudjoe KS and Hofshagen M, 2007.** Enumeration of thermotolerant *Campylobacter* spp. from poultry carcasses at the end of the slaughter-line. *Lett Appl Microbiol*, 44, 92-7.
- **Kaiser P, Howell MMJ, Fife M, Sadeyen JR, Salmon N, Rothwell L, Young J, Poh TY, Stevens M, Smith J, Burt D, Swaggerty C and Kogut M, 2009.** Towards the selection of chickens resistant to *Salmonella* and *Campylobacter* infections. *Bull Mem Acad R Med Belg*, 164, 17-25; discussion 25-6.
- **Kapperud, G., Espeland, G., Wahl, E., Walde, A., Herikstad, H., Gustavsen, S., Tveit, I., Natas, O., Bevanger, L., and Digranes, A..(2003).** Factors 99 associated with increased and decreased risk of *Campylobacter* infection: a prospective case-control study in Norway.*Am. J. Epidemiol.*,158:234-242
- **Keener KM, Bashor MP, Curtis PA, Sheldon BW and Kathariou S, 2004.** Comprehensive review of *Campylobacter* and poultry processing. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 3, 105-16.
- **Kim S-H, Chelliah R, Ramakrishnan SR, Perumal AS, Bang W-S, Rubab M, Daliri EB-M, Barathikannan K, Elahi F, Park E, Jo HY, Hwang S-B and Oh DH (2021)** Review on Stress Tolerance in *Campylobacter jejuni*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 10:596570. doi: 10.3389/fcimb.2020.596570
- **Kobierecka, P.A., Olech, B., Ksikażek, M., Derlatka, K., Adamska, I., Majewski, P. M., Jagusztyn-Krynicka EK, Wyszynska AK . (2016).**Cell wall anchoring of the *Campylobacter*antigens to *Lactococcus lactis*.*Front. Microbiol.* 7:165.
- **Koene MG, Houwers DJ, Dijkstra JR, Duim B, Wagenaar JA (2004).** Simultaneous presence of multiple *Campylobacter* species in dogs. *J Clin Microbiol* 2004;42(2):819-21
- **Konkel Michael E., Bong J. Kim, Vanessa Rivera-Amill and Steven G. Garvis, 1999;** Bacterial secreted proteins are required for the internalization of *Campylobacter jejuni* into cultured mammalian cells Department of Microbiology, Washington State University, Pullman, Washington 99164-4233, USA.
- **Kothary MH, Babu US (2001).** Infective dose of foodborne pathogens in volunteers: a review. *J Food Saf* 2001;21:49-68.

- Kovacs, J. K., Felso, P., Horvath, G., Schmidt, J., Dorn, A., Abraham, H., et al. (2019). Stress response and virulence potential modulating effect of peppermint essential oil in *Campylobacter jejuni*. *BioMed. Res. Int.* 2019, 2971741. doi: 10.1155/2019/2971741
- Lake, I. R., Colón-González, F. J., Takkinen, J., Rossi, M., Sudre, B., Dias, J. G., et al. (2019). Exploring *Campylobacter* seasonality across Europe using The European Surveillance System (TESSy), 2008 to 2016. *Euro Surveill.* 24, 1800028. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2019.24.13.180028
- Lamhonwah A., Ackerley C., Onizuka R., Tiups A., Lamhonwah D., Chung C. et al. 2005. Epitope shared by functional variant of organic cation/carnitine transporter, OCTN1, *Campylobacter jejuni* and *Mycobacterium paratuberculosis* may underlie susceptibility to Crohn's disease at 5q31. *Biochem Biophys Res Commun.* 337: 1165-1175
- Lastovica, A. J. e Skirrow, M. B. (2000): in *Campylobacter*, 2nd edn (eds. Nachamkin, I. e Blaser, M. J.) 89–120 (American Society for Microbiology, Washington, 2000).
- Lee, A., Smith, S. C., and Coloe, P. J. (1998). Survival and growth of *Campylobacter jejuni* after artificial inoculation onto chicken skin as a function of temperature and packaging conditions. *J. Food Prot.* 61, 1609–1614.
- Lei Dai, Orhan Sahin, Madhusudan Grover, Qijing Zhang (2020): New and alternative strategies for the prevention, control, and treatment of antibiotic-resistant *Campylobacter*, *Translational Research* (2020), doi: <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2020.04.009>
- Levin RE., (2007): *Campylobacter jejuni*: A review of its characteristics, pathogenicity, ecology, distribution, subspecies characterization and molecular methods of detection. *Food Biotechnology* 2007;21:271-347
- Lin J, 2009. Novel approaches for *Campylobacter* control in poultry. *Foodborne Pathogens and Disease*, 6, 755-65.
- Line JE, Svetoch EA, Eruslanov BV, Perelygin VV, Mitsevich EV, Mitsevich IP, Levchuk VP, Svetoch OE, Seal BS, Siragusa GR and Stern NJ, 2008. Isolation and purification of enterocin e760 with broad antimicrobial activity against gram-positive and gram-negative bacteria. *Antimicrob Agents Chemother*, 52, 1094-100.
- Lindmark, H., B. Harbom, L. Thebo, L. Andersson, G. Hedin, B. Osterman, T. Lindberg, Y. Andersson, A. Westöö, and E. O. Engvall. (2004). Genetic characterization and antibiotic

resistance of *Campylobacter jejuni* isolated from meats, water, and humans in Sweden. *J. Clin. Microbiol.*, 42:700-706.

- **Lyngstad TM, Jonsson ME, Hofshagen M and Heier BT**, 2008. Risk factors associated with the presence of *Campylobacter* species in Norwegian broiler flocks. *Poult Sci*, 87, 1987-94.
- **Loc Carrillo C, Atterbury RJ, El-Shibiny A, Connerton PL, Dillon E, Scott A and Connerton IF**, 2005. Bacteriophage therapy to reduce *Campylobacter jejuni* colonization of broiler chickens. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 6554-63.
- **Lourdes García-Sánchez, Beatriz Melero, Jordi Rovira (2018)**: *Campylobacter* in the Food Chain, 2018, Biotechnology and Food Science Department, University of Burgos, Burgos, Spain
- **Luber, P1., Brynestad, S., Topsch, D., Scherer, K., Bartelt, E.** (2006) Quantification of *Campylobacter* Species Cross-Contamination during Handling of Contaminated Fresh Chicken Parts in Kitchens. *Appl Environ Microbiol.* 72(1): 66–70.
- **Luber, P., Bartelt, E.** (2007) Enumeration of *Campylobacter* spp. on the surface and within chicken breast fillets. *J Appl Microbiol.*, 102(2):313-318.
- **Luning PA, Bango L, Kussaga J, Rovira J and Marcelis WJ**, 2008. Comprehensive analysis and differentiated assessment of food safety control systems: A diagnostic instrument. *Trends in Food Science & Technology*, 19, 522-34.
- **MacDonald E., White R, Mexia R, Bruun T, Kapperud G, Lange H, Nygård K, Vold L.** (2015) Risk Factors for Sporadic Domestically Acquired *Campylobacter* Infections in Norway 2010-2011: A National Prospective Case-Control Study. *PLoS One.* 10(10)
- **Man S M** (2011): The clinical importance of emerging *Campylobacter* species. *Nature Review/Gastroenterol Hepatol* 8:669-685.
- **Mattick K., Durham K., Domingue G., Jørgensen F., Sen M., Schaffner DW., Humphrey T.** (2003) The survival of foodborne pathogens during domestic washing-up and subsequent transfer onto washing-up sponges, kitchen surfaces and food. *Int J Food Microbiol.* 85(3):213-226.
- **Meunier M, Guyard-Nicodème M, Vigouroux E, Poezevara T, Béven V, Quesne S, Amelot M, Parra A, Chemaly M, Dory D.** Vaccine. 2018; A DNA prime/protein boost vaccine protocol

developed against *Campylobacter jejuni* for poultry. 2018 Apr 12;36(16):2119-2125. doi: 10.1016/j.vaccine.2018.03.004.

- **Mohyla P, Bilgili SF, Oyarzabal OA, Warf CC and Kemp GK, 2007.** Application of acidified sodium chlorite in the drinking water to control *Salmonella* serotype Typhimurium and *Campylobacter jejuni* in commercial broilers. *J Appl Poult Res*, 16, 45-51.
- **Moore JE, Corcoran D, Dooley JSG, Fanning S, Lucey B, Matsuda M, McDowell DA, Megraud F, Millar BC, Mahoney RO, Riordan LO, Rourke MO, Rao JR, Sails A, Whyte P. (2005):** *Campylobacter*. *Vet Res* 2005;36:351-82.
- **Murray P. R, Rosenthal, K S., Pfaller, M A. (2003)** *Microbiologia medica*. EDISES, Elsevier Masson, Milano
- **Nachamkin I. et al. (1998).** *Campylobacter* spp. and Guillain-Barrè syndrome. *Clin Microbiol Rev* . 11: 555-567
- **Neal KR, Slack RC. (1997)** Diabetes mellitus, anti-secretory drugs and other risk factors for *Campylobacter* gastro-enteritis in adults: a case-control study. *Epidemiol Infect* 1997;119:307-11.
- **Neal-McKinney, J.M., Samuelson, D.R., Eucker, T.P., Nissen, M.S., Crespo, R. and Konkel, M.E. (2014)** Reducing *Campylobacter jejuni* colonization of poultry via vaccination. *PLoS ONE*, 9(12)
- **Negash, T., al-Garib, S.O., Gruys, E. (2004).** Comparison of in ovo and posthatch vaccination with particular reference to infectious bursal disease. A review. *Vet. Q.*26:76–87.
- **Newell DG, Shreeve JE, Toszeghy M, Domingue G, Bull S, Humphrey T and Mead G, 2001.** Changes in the carriage of *Campylobacter* strains by poultry carcasses during processing in abattoirs. *Appl Environ Microbiol*, 67, 2636-40.
- **Newell D.G., Fearnley C. (2003).** Sources of *Campylobacter* colonization in broiler chickens. *Appl Environ Microbiol*. 69: 4343-4351
- **Nielsen, L. N., Luijckx, T. A., Vegge, C. S., Johnsen, C. K., Nuijten, P., Wren, B. W., Ingmer H, Kroghfelt KA (2012).** Identification of immunogenic and virulence-associated *Campylobacter jejuni* proteins. *Clin. Vaccine Immunol.*,19:113–119.

- **Pan, D., Yu, Z. (2014).**Intestinal microbiome of poultry and its interaction with host and diet. *Gut Microbes*5:108–119. **Park, S. F. (2002).** The physiology of *Campylobacter* species and its relevance to their role as foodborne pathogens. *Int. J. Food Microbiol.* 74, 177–188
- **Pearson AD, Greenwood M, Healing TD, Rollins D, Shahamat M, Donaldson J and Colwell RR, 1993.** Colonization of broiler chickens by waterborne *Campylobacter jejuni*. *Appl Environ Microbiol*, 59, 987-96.
- **Poropatich Kate O., Fischer Walker Christa L., and Black Robert E. (2010):** Quantifying the Association between *Campylobacter* Infection and Guillain-Barré Syndrome: A Systematic Review. *Health popul nutr* 2010 Dec;28(6):545-552
- **Poursina, F., Fagri, J., Mirzaei, N., and Safaei, H. G. (2018).** Overexpression of *spoT* gene in coccoid forms of clinical *Helicobacter pylori* isolates. *Folia Microbiol.* 63, 459–465. doi: 10.1007/s12223-017-0557-0
- **Psifidi A., M Fife, J Howell, O Matika, P M van Diemen, R Kuo, J Smith, P M Hocking, N Salmon, M A Jones, D A Hume, G Banos, M P Stevens, P Kaiser, 2016;** The genomic architecture of resistance to *Campylobacter jejuni* intestinal colonisation in chickens
- **Ramabu, S.S.,Boxall, N.S.,Madie, Pand Fenwick, S.G. (2004):** Some potential sources for transmission of *Campylobacter jejuni* to broiler chickens. *Lett Appl Microbiol*39:252–256
- **Rasschaert G, Houf K and De Zutter L, 2007.** External contamination of *Campylobacter*-free flocks after transport in cleaned and disinfected containers. *J Food Prot*, 70, 40-6.
- **REGOLAMENTO (CE) N. 852/2004 DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO del 29 aprile 2004** sull'igiene dei prodotti alimentari.
- **REGOLAMENTO (CE) N. 178/2002 DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO del 28 gennaio 2002** che stabilisce i principi e i requisiti generali della legislazione alimentare, istituisce l'Autorità europea per la sicurezza alimentare e fissa procedure nel campo della sicurezza alimentare.
- **REGOLAMENTO (CE) n. 2073/2005 DELLA COMMISSIONE del 15 novembre 2005** sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari
- **REGOLAMENTO (CE) N. 1099/2009 DEL CONSIGLIO del 24 settembre 2009** relativo alla protezione degli animali durante l'abbattimento

- **REGOLAMENTO (UE) 2017/1495 DELLA COMMISSIONE** del 23 agosto 2017 che modifica il regolamento (CE) n. 2073/2005 per quanto riguarda il *Campylobacter* nelle carcasse di polli da carne.
- **REGOLAMENTO (UE) N. 1169/2011 DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO** del 25 ottobre 2011 relativo alla fornitura di informazioni sugli alimenti ai consumatori, che modifica i regolamenti (CE) n. 1924/2006 e (CE) n. 1925/2006 del Parlamento europeo e del Consiglio e abroga la direttiva 87/250/CEE della Commissione, la direttiva 90/496/CEE del Consiglio, la direttiva 1999/10/CE della Commissione, la direttiva 2000/13/CE del Parlamento europeo e del Consiglio, le direttive 2002/67/CE e 2008/5/CE della Commissione e il regolamento (CE) n. 608/2004 della Commissione
- **REGOLAMENTO DI ESECUZIONE (UE) 2019/627 DELLA COMMISSIONE** del 15 marzo 2019 che stabilisce modalità pratiche uniformi per l'esecuzione dei controlli ufficiali sui prodotti di origine animale destinati al consumo umano in conformità al regolamento (UE) 2017/625 del Parlamento europeo e del Consiglio e che modifica il regolamento (CE) n. 2074/2005 della Commissione per quanto riguarda i controlli ufficiali
- **Rigby CE, Pettit JR, Baker MF, Bentley AH, Salomons MO and Lior H, 1980.** Sources of *Salmonellae* in an uninfected commercially-processed broiler flock. *Canadian Journal of Comparative Medicine-Revue Canadienne De Medecine Comparee*, 44, 267-74.
- **Rodríguez Yhojan, Manuel Rojas, Yovana Pacheco, Yeny Acosta-Ampudia, Carolina Ramírez-Santana, Diana M Monsalve, M Eric Gershwin and Juan-Manuel Anaya, (2018);** Guillain–Barré syndrome, transverse myelitis and infectious diseases. *Cellular and Molecular Immunology* (2018) 15, 547–562; doi:10.1038/cmi.2017.142; published online 29 January 2018
- **Rosenquist H, Sommer HM, Nielsen NL and Christensen BB, 2006.** The effect of slaughter operations on the contamination of chicken carcasses with thermotolerant *Campylobacter*. *Int J Food Microbiol*, 108, 226-32.
- **Rosenquist, H., Boysen, L., Galliano, C., Nordentoft, S., Ethelberg, S. and Borck, B. (2009)** Danish strategies to control *Campylobacter* in broilers and broiler meat: facts effects. *Epidemiol Infect*, 137:1742–1750.
- **Rosef O., Rettedal G., Lageide L. (2001).** Thermophilic *Campylobacters* in surface water: a potential risk of *Campylobacter*. *Int J Environ Health Res*. 11: 321-327

- **Rubin C. J., Zody M. C., Eriksson J., Meadows J. R., Sherwood E., Webster M. T., et al. (2010).** Whole-genome resequencing reveals loci under selection during chicken domestication. *Nature* 464:587–591.
- **Rusin, P., S. Maxwell, and C. Gerba.(2002).** Comparative surface-to-hand and fingertip-to-mouth transfer efficiency of gram-positive bacteria, gram-negative bacteria, and phage. *J. Appl. Microb.*, 93:585-592.
- **Sahin O, Yaeger M, Wu Z, Zhang Q. (2017):** *Campylobacter*-associated diseases in animals. *Annu Rev Anim Biosci* 2017;5:21-42.
- **Sampers, I., Habib, I., De Zutter, L., Dumoulin, A., Uyttendaele, M. (2010):** Survival of *Campylobacter* spp. in poultry meat preparations subjected to freezing, refrigeration, minor salt concentration, and heat treatment. *Int J Food Microbiol.*, 137(2–3):147–153.
- **Scott AE, Timms AR, Connerton PL, Loc Carrillo C, Adzfa Radzum K and Connerton IF, 2007.** Genome dynamics of *Campylobacter jejuni* in response to bacteriophage predation. *PLoS Pathog*, 3 (8), e119.
- **Seliwiorstow, T., Baré, J., Berkvens, D., Van Damme, I., Uyttendaele, M., De Zutter, L. (2016)** Identification of risk factors for *Campylobacter* contamination levels on broiler carcasses during the slaughter process. *Int J Food Microbiol.* 226:26-32.
- **Seliwiorstow, T., Baré, J., Van Damme, I., Uyttendaele, M., De Zutter, L. (2015)** *Campylobacter* carcass contamination throughout the slaughter process of *Campylobacter*-positive broiler batches. *Int J Food Microbiol.* 194:25-31.
- **Shane S.M., Montrose M.S. (1985).** The occurrence and significance of *Campylobacter jejuni* in man and animals. *Vet Res Commun.* 9: 167- 198
- **Silva, J., Leite, D., Fernandes, M. Mena, C., Gibbs, PA., Teixeira, P. (2011):** “*Campylobacter* spp. as a foodborne pathogen: a review”. *Frontiers in Microbiology*, 2:1-12.
- **Skirrow MB. (1994):** Diseases due to *Campylobacter*, *Helicobacter* and related bacteria. *J Comp Pathol* 1994;111:113-49.
- **Slader, J., Domingue, G., Jorgensen, F., McAlpine, K., Owen, R.J., Bolton, F.J. and Humphrey, T.J. (2002):** Impact of transport crate reuse and of catching and processing on *Campylobacter* and *Salmonella* contamination of broiler chickens. *Appl Environ Microbiol*, 68:713–719.

- **Sparks NHC**, 2009. The role of the water supply system in the infection and control of *Campylobacter* in chicken. *Worlds Poultry Science Journal*, 65, 459-73
- **Stern, N. J., and Kazmi, S. U. (1989)**. "*Campylobacter jejuni*," in *Foodborne Bacterial Pathogens*, ed. M. P. Doyle (New York: Marcel Dekker Inc.), 71–110.
- **Stern, N. J., and Kotula, A. W. (1982)**. Survival of *Campylobacter jejuni* inoculated into ground beef. *Appl. Environ. Microbiol.* 44, 1150–1153.
- **Stern N. J., Cox N.A., Musgrove M.T. (2001)**. Incidence and levels of *Campylobacter* in broilers after exposure to an inoculated seeder bird. *J Appl Res.* 10: 315-318
- **Stern NJ, Fedorka-Cray P, Bailey JS, Cox NA, Craven SE, Hiatt KL, Musgrove MT, Ladely S, Cosby D and Mead GC, 2001b**. Distribution of *Campylobacter* spp. in selected US poultry production and processing operations. *Journal of Food Protection*, 64, 1705-10
- **Stern NJ, Robach MC, Coxa NA and Musgrove MT, 2002**. Effect of drinking water chlorination on *Campylobacter* spp. colonization of broilers. *Avian Diseases*, 46, 401-04.
- **Stern, N.J., Hiatt, K.L., Alfredsson, G.A., Kristinsson, K.G., Reiersen, J., Hardardottir, H., Briem, H., Gunnarsson, E. Georgsson, F., Lowman ,R, Berndtson, E., Lammerding, AM., Paoli, GM., Musgrove, MT.(2003)** *Campylobacter* spp. in icelandic poultry operations and human disease. *Epidemiol Infect*, 130: 23–32.
- **Stern NJ, Svetoch EA, Eruslanov BV, Kovalev YN, Volodina LI, Perelygin VV, Mitsevich EV, Mitsevich IP and Levchuk VP, 2005**. Paenibacillus polymyxa purified bacteriocin to control *Campylobacter jejuni* in chickens. *Journal of Food Protection*, 68, 1450-53.
- **Stern NJ and Pretanik S, 2006**. Counts of *Campylobacter* spp. on us broiler carcasses. *Journal of Food Protection*, 69, 1034-39
- **Svetoch EA, Eruslanov BV, Perelygin VV, Mitsevich EV, Mitsevich IP, Borzenkov VN, Levchuk VP, Svetoch OE, Kovalev YN, Stepanshin YG, Siragusa GR, Seal BS and Stern NJ, 2008**. Diverse antimicrobial killing by *Enterococcus faecium* E 50-52 bacteriocin. *J Agric Food Chem*, 56, 1942- 8.
- **Thakur S, Gebreyes WA. (2005)**: Prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter* in antimicrobial-free and conventional pig production systems. *J Food Prot* 2005;68:2402-10.].

- Theoret, J. R., Cooper, K. K., Zekarias, B., Roland, K. L., Law, B. F., Curtiss, R., III. Joens, LA.(2012).The *Campylobacter jejuni* Dps homologue is important for in vitro biofilm formation and cecal colonization of poultry and may serve as a protective antigen for vaccination.Clin. Vaccine Immunol.,19:1426– 1431.
- Thompson KL and Applegate TJ, 2008. Optimizing feed withdrawal programs. Purdue University Extension, AS-576-W. [http://www.ces.purdue.edu/extmedia/AS/AS\\_576\\_W.pdf](http://www.ces.purdue.edu/extmedia/AS/AS_576_W.pdf) (accessed 10/05/2011).
- Tsai HJ, Huang HC, Lin CM, Lien YY, Chou CH (2007). Salmonellae and *Campylobacters* in household and stray dogs in northern Taiwan. Vet Res Commun 2007;31(8):931-9.
- Young Kathryn T., Lindsay M. Davis and Victor J. DiRita, 2007; *Campylobacter jejuni*: molecular biology and pathogenesis; Nature Publishing Group
- van de Giessen A, Mazurier SI, Jacobs-Reitsma W, Jansen W, Berkers P, Ritmeester W and Wernars K, 1992. Study on the epidemiology and control of *Campylobacter jejuni* in poultry broiler flocks. Appl Environ Microbiol, 58, 1913-7.
- van de Giessen AW, Tilburg JJ, Ritmeester WS and van der Plas J, 1998. Reduction of *Campylobacter* infections in broiler flocks by application of hygiene measures. Epidemiol Infect, 121, 57-66.
- Vandamme, P. (2000). "Taxonomy of the family *Campylobacteraceae*," in *Campylobacter*, eds I. Namchamkin and M. J. Blaser (Washington, DC: ASM), 3–27.
- Vandamme P, Dwhirst F E, Paster B J, On S LW (2005): Family I. *Campylobacteraceae* in Garrity G M et al. editors "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology", 11nd ed., vol. 2, Springer, New York, (USA), 1145- 1168.
- Wagenaar JA, Van Bergen MA, Mueller MA, Wassenaar TM and Carlton RM, 2005. Phage therapy reduces *Campylobacter jejuni* colonization in broilers. Vet Microbiol, 109, 275-83.
- Wijdicks EF, Klein CJ. (2017) Guillain–Barré Syndrome. Mayo Clin Proc 2017; 92: 467–479.
- Zeng, X., Xu, F., Lin, J. (2010). Development and evaluation of CmeC subunit vaccine against *Campylobacter jejuni*. J. Vaccines Vaccin.,1:112
- Zhao, Z., Peng, T., Oh, J. I., Glaeser, J., Weber, L., Li, Q., et al. (2019). A response regulator of the OmpR family is part of the regulatory network controlling the oxidative stress response

of *Rhodobacter sphaeroides*. *Environ. Microbiol. Rep.* 11, 118–128. doi: 10.1111/1758-2229.12718

## Sitografia

- <https://www.efsa.europa.eu/en>
- <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>
- <http://www.cdc.gov/foodborneburden/trends-in-foodborne-illness.html>