

COMUNICAZIONE 5

CONSIDERAZIONI SUGLI ISOLAMENTI DI CAMPYLOBACTER TERMOFILI OTTENUTI DAGLI ANIMALI E DALL'AMBIENTE: RISULTATI PRELIMINARI

L. DIPINETO¹, G. MATTEOLI¹, F. DI PRISCO², M.C. LANDOLFI², S. MONTAGNARO¹, L.F. MENNA¹

¹Dipartimento di Patologia e Sanità Animale, Università di Napoli Federico II

²Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno Sez. Avellino

Parole chiave: Campylobacter termofili, galline ovaiole, ambiente

Consideration on Campylobacter isolation from animals and environment: preliminary results

Key words: Campylobacter thermophilus, laying hens, environment

Summary: An investigation on 6 flocks of laying hens was carried out in order to evaluate the correlation between environment contamination and animal infection by Campylobacter spp. Our results showed how these two parameters are correlated and influenced by rearing management.

Correspondence: Lucia Francesca Menna, Dipartimento di Patologia e Sanità Animale, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Napoli Federico II. E-mail: menna@unina.it

Introduzione

Le tossinfezioni indotte da microrganismi termofili del genere Campylobacter vengono segnalate con frequenza sempre maggiore nell'uomo raggiungendo, nei paesi industrializzati, una incidenza che spesso supera le tossinfezioni da Salmonella spp. (3,4). In natura i principali serbatoi di Campylobacter termofili sono rappresentati dagli uccelli e, in particolare, dai volatili domestici con percentuali di positività di circa il 75% nei broiler e 80% nelle ovaiole (3).

La trasmissione dell'infezione avviene per via orizzontale con una tipica diffusione a macchia d'olio (3). L'infezione sarebbe dunque acquisita dopo la schiusa, mediata dai numerosi vettori (animati e inanimati) che i Campylobacter spp. sfruttano nel loro ciclo biologico.

Il ruolo di vettore è svolto principalmente dalla lettiera e da tutte le strutture interne ai capannoni (gabbie, mangiatoie, abbeveratoi, finestre, ventilatori) oltre che dal mangime e dall'acqua di abbeverata contaminati da feci di animali infetti (6). Un ruolo epidemiologico importante verrebbe inoltre svolto da altri vettori quali insetti, roditori, animali domestici e selvatici, nonché dagli operai addetti all'allevamento mediante l'introduzione e la diffusione del germe nei capannoni (1).

Scopo del presente lavoro è quello di fornire un contributo sull'analisi delle correlazioni esistenti tra i Campylobacter isolati dagli animali e quelli isolati dall'ambiente in modo da ampliare le conoscenze sull'ecoepidemiologia di tale microrganismo necessarie per ridurre la prevalenza dell'infezione tra gli animali e la conseguente trasmissione all'uomo.

Materiali e Metodi

Campionamento: Da settembre 2001 a giugno 2002 sono stati effettuati 300 campioni in 6 allevamenti di galline ovaiole distribuiti nella regione Campania. Gli animali controllati erano circa 96.900, allevati in gabbia, all'interno di capannoni condizionati. L'età degli animali e la consistenza dei gruppi controllati è riportata in tabella 1.

In ogni allevamento sono stati effettuati 50 prelievi, di cui: 30 tamponi cloacali, 5 tamponi ambientali (pareti, sistema di ventilazione, gabbie), 5 prelievi di mangime dalle canalette di alimentazione, 5 di acqua prelevata dagli abbeveratoi e 5 di acqua prelevata dalle vasche di distribuzione.

Isolamento ed identificazione: I passaggi necessari per l'isolamento di Campylobacter termofili sono stati effettuati seguendo la metodica consigliata da Di Modugno G. *et al.*, 1997 (1). I ceppi di *C.jejuni* isolati in due allevamenti (All. B,C) sono stati sottoposti a genotipizzazione utilizzando la PCR-RFLP per il gene della flagellina A (*flaA*) seguendo le metodiche consultate in letteratura (7).

Risultati

I risultati della nostra indagine hanno evidenziato la presenza di *Campylobacter* termofili in 5 dei 6 allevamenti controllati. Dai prelievi effettuati 152 sono risultati positivi, inoltre, mediante le prove d'identificazione biochimica è stato possibile differenziare la specie: 133 ceppi sono risultati *C.jejuni*, 17 *C.coli*, 2 *C.upsaliensis*; non sono stati invece isolati *C.lari*.

Le percentuali di positività dei tamponi cloacali e dei campioni ambientali sono riportate nella tabella 2.

L'analisi dei profili di restrizione dei 14 ceppi di *C.jejuni* genotipizzati dell'allevamento B, ottenuti con *Hinfl*, ha evidenziato 5 profili di restrizione diversi; la digestione con l'enzima *Ddel*, 5 profili di restrizione contenenti un numero molto elevato di bande; la digestione dei 34 ceppi (*C.jejuni*) dell'allevamento C con *Hinfl*, 7 profili di restrizione diversi. Classificare i campioni dell'allevamento C (n.34) digeriti con *Ddel*, nei diversi gruppi (n.14) ottenuti, è risultata più complessa per il numero elevato di bande.

I ceppi dell'allevamento B che hanno presentato un profilo di restrizione identico per entrambe gli enzimi di restrizione sono stati 5 sui 14 analizzati (35,71%) mentre, nell'allevamento C, sono stati 14 su 34 analizzati (41,17%).

Discussione

Anche se la presente ricerca risulta la fase iniziale di uno studio più ampio volto ad apportare un contributo alle conoscenze sulla epidemiologia delle infezioni da Campylobacter termofili, il primo aspetto da porre in rilievo concerne l'andamento dell'infezione in relazione all'età. Nelle prime settimane di vita, infatti, risultava nulla, mentre si positivizzava in età adulta. Tale andamento risulterebbe tipico di una trasmissione per via orizzontale piuttosto che per via verticale, con un'infezione acquisita dunque dopo la schiusa.

Gli animali adulti, invece, presentavano una elevata diffusione dell'infezione, con una percentuale variabile dal 54,2% al 100%. Quindi il germe si presenterebbe

in maniera consistente anche in animali sempre allevati in gabbia, come le galline ovaiole, in condizioni che non sembrerebbero favorire la diffusione del germe attraverso il consueto ciclo oro-fecale.

Inoltre, è emerso un andamento decrescente della percentuale d'infezione con il progredire del ciclo produttivo. Questo dato riportato anche in letteratura non è pienamente spiegabile allo stato attuale e pertanto richiede ulteriori approfondimenti (2).

La genotipizzazione dei diversi isolati di *Campylobacter jejuni* effettuata mediante PCR-RFLP ha evidenziato la presenza nello stesso allevamento di diversi ceppi, contrariamente a quanto ci si attenderebbe in questa tipologia d'allevamento.

Tale osservazione è supportata dai dati presenti in letteratura che descrivono una marcata instabilità del genoma e una elevata variabilità dei geni che codificano per le proteine di superficie (5,8).

Più complessa invece si è rivelata la interpretazione della correlazione esistente tra la contaminazione ambientale da *Campylobacter* termofili e la relativa percentuale di animali infetti. In proposito la letteratura forniva evidenze di un andamento correlato dei due parametri, mentre i nostri dati si discostano in maniera significativa da quelli attesi. Una analisi più approfondita ha consentito di spiegare questo apparente divario in virtù del tempo di permanenza relativamente breve degli animali nei capannoni (All.B) e delle diverse tecniche di allevamento (All.D e F) caratterizzate dall'applicazione di norme igienico-sanitarie più accurate ed appropriate.

Da quanto esposto, l'introduzione di adeguate norme di profilassi obbligatorie, come è avvenuto per la *Salmonella enteritidis*, sarebbe auspicabile al fine di ridurre l'infezione e la conseguente contaminazione dei prodotti alimentari di origine aviaria poiché, come

Tabella 1: Età e consistenza dei gruppi esaminati

Table 1: Age and number of flocks investigated

| Allevamento | A | B | C | D | E | F |
|-------------|-------|-------|--------|--------|--------|--------|
| N° Animali | 6.500 | 7.400 | 14.500 | 15.000 | 35.500 | 18.000 |
| Età (sett.) | 2 | 17 | 22 | 35 | 51 | 104 |

già accennato, questa infezione sta rappresentando un notevole problema anche per la salute pubblica.

Bibliografia

1. Di Modugno G., Camarda A., Nasti R. (1997) Introduzione e propagazione di *Campylobacter jejuni* in allevamenti di boiler. Presenza del germe su cute prima della macellazione e possibile influenza sulla contaminazione delle carni. *Sel. Vet.* 8/9:757-767
2. Di Modugno G., Nasti R., Camarda A. (1998) Ricerche sulla presenza di *Campylobacter jejuni* nell'apparato riproduttore di ovaiole in deposizione. *Sel. Vet.* 9: 637-643
3. Di Modugno G., Camarda A., Circella E., Ficarella V. (2000) Aspetti epidemiologici delle infezioni da *Campylobacter jejuni* negli allevamenti di pollame. *Sel. Vet.* 11:978-997
4. Euzeby J.P. (1993) Le tossinfezioni alimentari causate da batteri del genere *Campylobacter*. *Summa* 7: 49-58
5. Harrington C.S., Thomson-Carter F.M., Carter P.E., (1997) Evidence for recombination in the flagellin locus of *Campylobacter jejuni*: implication for the flagellin genotyping scheme. *J. Clin. Microbiol.* 35
6. Montrose M.S., Shane S.M., Harrington K.S. (1985) Role of litter in the transmission of *Campylobacter jejuni*. *Avian Dis* 29:392-399
7. Nachamkin I., Huong Ung and Charlotte M. Patton (1996) Analysis of HL and O Serotypes of *Campylobacter* strain by the Flagellin Gene Typing System. *J. Clin. Microb.* 34, 2:277-281
8. Parkill J., Wren B.W., Mungall K., Ketley J.M., Churcer C., Basham D., Chillingworth T., Davies R.M., Holroyd S., Jagels K., Karlyshev A.V., Moule S., Pallens M.J., Penn C.W., Quail M.A., Rajandream M.A., Rutherford K.M., Van Vliet A.H.M., Whitehead S., Barrell B.G. (2000) The genome sequence of food-borne pathogen *Campylobacter jejuni* reveals hypervariable sequences. *Nature* 403, 665-668 Macmillan Publishers Ltd <http://www.nature.com>

Tabella 2: Isolamenti di *Campylobacter* spp. in gruppi di galline ovaiole

Table 2: Isolation of *Campylobacter* spp. from laying hens flocks

| Campioni prelevati da: | Allevamento A | | | Allevamento B | | | Allevamento C | | |
|----------------------------|---------------|-------------|-----------------|---------------|-------------|-----------------|---------------|-------------|-----------------|
| | N° Campioni | N° positivi | % di positività | N° Campioni | N° positivi | % di positività | N° Campioni | N° positivi | % di positività |
| Tamponi Cloacali | 30 | 0 | 0 | 30 | 30 | 100 | 35 | 32 | 91 |
| Ambiente* | 6 | 0 | 0 | 5 | 0 | 0 | 9 | 6 | 66,6 |
| Mangime | 4 | 0 | 0 | 5 | 0 | 0 | 5 | 1 | 20 |
| Acqua (abbeveratoi) | 4 | 0 | 0 | 5 | 0 | 0 | 3 | 1 | 33,3 |
| Acqua (vaschette) | 4 | 0 | 0 | 5 | 0 | 0 | 2 | 1 | 50 |
| Campioni prelevati da: | Allevamento D | | | Allevamento E | | | Allevamento F | | |
| | N° Campioni | N° positivi | % di positività | N° Campioni | N° positivi | % di positività | N° Campioni | N° positivi | % di positività |
| Tamponi Cloacali | 30 | 29 | 96,6 | 32 | 21 | 65,6 | 35 | 19 | 54,2 |
| Ambiente* | 5 | 1 | 20 | 6 | 1 | 16,6 | 4 | 0 | 0 |
| Mangime | 5 | 1 | 20 | 3 | 1 | 33,3 | 3 | 0 | 0 |
| Acqua (abbeveratoi) | 5 | 0 | 0 | 5 | 2 | 40 | 4 | 1 | 25 |
| Acqua (vaschette) | 5 | 2 | 40 | 3 | 3 | 100 | 3 | 0 | 0 |

*Per ambiente si intendono prelievi effettuati da: pareti, sistema di ventilazione, gabbie, etc.