

MONITORAGGIO LONGITUDINALE PER IL RILIEVO DI *CAMPYLOBACTER* TERMOFILICI IN ALLEVAMENTI DI TACCHINI DA CARNE

Giacomelli M.¹, Andrighetto C.², Lombardi A.², Martini M.¹, Piccirillo A.¹

¹*Dipartimento di Sanità Pubblica, Patologia Comparata e Igiene Veterinaria, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Padova, Viale dell'Università, 16 - 35020 Legnaro (Padova).*

²*Istituto per la Qualità e le Tecnologie Agroalimentari, Veneto Agricoltura, Via San Gaetano, 74 - 36016 Thiene (Vicenza).*

Summary

Longitudinal studies were conducted in commercial meat turkey farms in order to investigate on the occurrence of thermophilic *Campylobacter* species and to evaluate the trend of infection during the entire production cycle (i.e. from day-old chicks up to slaughter time). Furthermore, *Campylobacter* species distribution analysis and genetic characterization of isolates were carried out, and their antimicrobial susceptibility profile was determined. Three flocks belonging to three different intensive farms located in the province of Vicenza, Veneto region, were examined. Samples were regularly collected at weekly intervals up to *Campylobacter* colonization of the flocks, then twice a month up to time of slaughter. A conventional culture method and a multiplex end-point PCR assay were used for *Campylobacter* detection and identification, respectively. Selected isolates were genetically characterized by Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)-PCR and by *flaA* short variable region (SVR) DNA sequencing. Antimicrobial susceptibility testing of isolates was performed by disk diffusion method. A high occurrence of thermophilic *Campylobacter* infection was detected, with colonization of birds persisting throughout the whole production cycle. Both *C. jejuni* and *C. coli* were recovered and a high genetic diversity was observed among them. Moreover, antimicrobial-resistance appeared to be widely spread among turkey campylobacters.

INTRODUZIONE

Le specie termofile di *Campylobacter* sono tra i principali responsabili di gastroenterite batterica umana in tutto il mondo e la causa della zoonosi più frequentemente riportata nell'Unione Europea (EFSA, 2010a). Inoltre, è sempre più frequente, e di conseguenza preoccupante, l'isolamento dagli animali, dagli alimenti e dall'uomo, di ceppi di *Campylobacter* resistenti nei confronti di numerosi antimicrobici, tra cui quelli di prima scelta nella terapia dell'infezione umana. Tutto ciò fa della campilobatteriosi un problema di Sanità Pubblica attuale e di notevole rilevanza.

Il *reservoir* del microrganismo è rappresentato dal tratto gastroenterico di numerosi mammiferi e uccelli domestici e selvatici, ma soprattutto dei volatili da reddito. Infatti, la principale fonte di infezione per l'uomo è costituita dal consumo di carne avicola poco cotta o di prodotti contaminati da questa. Nonostante sia stato dimostrato ormai da tempo l'importante ruolo svolto dalla carne di tacchino nella trasmissione dell'infezione all'uomo (Rosef *et al.*, 1984), la maggior parte dei dati

relativi alla diffusione di *Campylobacter* spp. negli avicoli da reddito è relativa ai polli da carne, mentre nei tacchini sono stati svolti pochissimi studi a riguardo. Pertanto, mentre si conosce bene l'epidemiologia di *Campylobacter* spp. nei broiler, molto rimane ancora da chiarire riguardo l'infezione nei tacchini da carne.

Date le scarse informazioni disponibili circa le dinamiche epidemiologiche del principale agente di zoonosi trasmessa per via alimentare in questa specie avicola allevata intensivamente per il consumo umano, il presente studio è stato intrapreso con molteplici scopi. Si è voluto indagare sulla presenza di *Campylobacter* termofili in allevamenti intensivi di tacchini da carne del Veneto, analizzare l'andamento dell'infezione durante l'intero ciclo produttivo (a partire dall'accasamento fino al momento del carico per la macellazione), valutare la distribuzione di specie dei microrganismi, caratterizzarli a livello genetico per osservarne la biodiversità, ed infine rilevare la sensibilità agli antimicrobici degli isolati.

MATERIALI E METODI

Campionamento

Tra settembre 2009 e maggio 2010 sono stati monitorati tre gruppi di tacchini da carne, due di femmine ed uno di maschi, provenienti da tre differenti allevamenti intensivi siti in Veneto, nella provincia di Vicenza. Le principali caratteristiche dei gruppi e degli allevamenti di provenienza sono riportate nella Tabella 1. In ciascun gruppo sono stati eseguiti campionamenti settimanali dalla schiusa fino alla positivizzazione, e successivamente a cadenza quindicinale fino al giorno del carico per la macellazione. Il primo campionamento è avvenuto all'incubatoio, dove è stato prelevato il meconio di 60 pulcini, mentre nei campionamenti successivi, svolti in allevamento, è stato eseguito un tampone cloacale a 60 soggetti scelti casualmente. Sia i campioni di meconio che i tamponi, questi ultimi collocati in terreno di trasporto Amies con carbone (Copan, Brescia, Italia), venivano conservati in borsa termica fino all'arrivo al laboratorio, dove pervenivano entro una-due ore dal prelievo, per poi essere processati immediatamente.

Isolamento e identificazione

L'isolamento di *Campylobacter* termofili dal meconio e dai tamponi cloacali è avvenuto secondo le linee guida della *World Organization for Animal Health* (OIE, 2008). I campioni, processati a *pool* di tre, sono stati inizialmente inoculati nel brodo di arricchimento selettivo Preston (OXOID, Basingstoke, UK) e incubati a 41,5 C in condizioni di microaerofilia, ottenuta in giare per anaerobiosi mediante i generatori CampyGen® (OXOID). Dopo 24 ore di incubazione, un'aliquota (150 µl) di ciascuna brodocoltura è stata seminata su Karmali agar (OXOID), previa filtrazione attraverso membrane sterili (Whatman, Maidstone, UK) con pori del diametro di 0,45 µm. Le piastre sono state incubate per 48 ore a 41,5 C in microaerofilia e quindi esaminate alla ricerca delle colonie tipiche di *Campylobacter* spp. Da ciascuna piastra positiva è stata prelevata una colonia da sottoporre ad identificazione di genere e di specie. Questa è stata eseguita mediante *end-point multiplex* PCR, secondo il protocollo descritto da Yamazaki-Matsune *et al.* (2007), utilizzando *primer* specifici per *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari* e *C. upsaliensis*, oltre ad una coppia di *primer* avente come target una sequenza del 16S rRNA comune a tutte le specie di *Campylobacter*. Il DNA è stato estratto mediante bollitura per 20 minuti

di un'ansata di patina batterica stemperata in 500 µl di acqua distillata sterile. Per la miscela di reazione, la concentrazione dei *primer* e la quantità di DNA analizzato ci si è attenuti a quanto indicato da Yamazaki-Matsune *et al.* (2007). Come controllo positivo sono stati utilizzati i seguenti ceppi di referenza: *C. jejuni* ATCC 33291, *C. coli* CIP 70.80, *C. lari* CIP 102722 e *C. upsaliensis* CIP 103681.

Tipizzazione molecolare

Una parte degli isolati (62) è stata analizzata mediante *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD)-PCR, allo scopo di caratterizzare i ceppi a livello genetico e di investigarne la biodiversità. Il saggio è stato condotto utilizzando i *primer* M13 (Huey & Hall, 1989) e AP4 (Barbier *et al.*, 1996), selezionati tra cinque diversi *primer* in quanto avevano prodotto il bandeggio più discriminante dopo amplificazione di ceppi di riferimento. Sono state seguite le condizioni di amplificazione e di successiva corsa elettroforetica descritte da Andrighetto *et al.* (2001). I profili di amplificazione ottenuti sono stati elaborati utilizzando il software GelCompar versione 4.1 (Applied Maths, Kortrijk, Belgio), mentre il *clustering* dei profili RAPD è stato ottenuto mediante il *Pearson product correlation coefficient* e l'*Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Averages* (UPGMA).

Gli stessi isolati sono stati successivamente sottoposti ad analisi di sequenza di una regione altamente polimorfa (*short variable region* - SVR) del gene *flaA*, codificante per la flagellina. Il frammento del gene *flaA* contenente la *short variable region* è stato amplificato mediante il protocollo di PCR descritto da Levesque *et al.* (2008) e successivamente sottoposto a sequenziamento. Le sequenze nucleotidiche ottenute sono state elaborate utilizzando il software MEGA 4.0 e il metodo di *clustering Neighbor-Joining*. Le sequenze sono state inoltre confrontate con quelle presenti nel database *flaA*-SVR della Oxford University (<http://pubmlst.org/campylobacter>), al fine di determinare le varianti alleliche (genotipi) e le corrispondenti varianti peptidiche da esse codificate.

Il potere discriminante di entrambe le metodiche di tipizzazione molecolare è stato espresso mediante l'indice di diversità di Simpson $D = 1 - \sum n(n-1)/N(N-1)$, dove n =numero di isolati con lo stesso profilo RAPD-PCR o stessa sequenza nucleotidica *flaA*, e N =numero totale di isolati (Hunter, 1990). L'indice D è compreso tra 0 (bassa discriminazione) e 1 (elevata discriminazione).

Valutazione della sensibilità agli antimicrobici

Una percentuale significativa dei ceppi isolati in ciascun gruppo di tacchini è stata sottoposta ad antibiogramma mediante il metodo di diffusione in piastra di Kirby-Bauer (1966). I ceppi, sospesi in soluzione fisiologica sterile (con una torbidità corrispondente allo 0,5 della scala di McFarland), sono stati inoculati in piastre di Mueller-Hinton agar (OXOID) addizionato del 5% di sangue defibrinato di montone (OXOID), quindi incubate a 37 C per 48 ore in microaerofilia. Nell'esecuzione dei test è stato incluso il ceppo *C. jejuni* ATCC 33560 come controllo positivo.

È stata valutata la sensibilità degli isolati nei confronti di 20 molecole appartenenti a 9 classi di antimicrobici, che includono quelli raccomandati dall'*European Food Safety Authority* (EFSA, 2007) relativamente a *C. coli* e *C. jejuni* e quelli maggiormente impiegati nella terapia dell'infezione umana e in avicoltura. Gli antimicrobici testati sono riportati nell'elenco seguente:

- Aminoglicosidi: apramicina 15 µg (OXOID), gentamicina 10 µg(OXOID), streptomina 10 µg (OXOID);
- Cefalosporine: cefalotina 30 µg (OXOID), cefotaxime 30 µg (OXOID); ceftiofur 30 µg (OXOID); cefuroxime 30 µg (OXOID);
- Penicilline: ampicillina 10 µg (OXOID), amoxicillina+acido clavulanico 30 µg (OXOID);
- Chinoloni: acido nalidixico 30 µg (OXOID), flumequina 30 µg (OXOID), enrofloxacin 5 µg (OXOID), ciprofloxacina 5 µg (OXOID);
- Lincosamidi: clindamicina 2 µg (OXOID);
- Macrolidi: eritromicina 15 µg (OXOID), tilmicosina 15 µg (Bio-Rad, Marnes la Coquette, Francia), tilosina 30 µg (Mast Diagnostics Ltd., Merseyside, UK);
- Sulfamidici+diaminopirimidine: sulfametossazolo+trimetoprim 25 µg (OXOID);
- Tetraciline: ossitetraciclina 30 µg (OXOID);
- Fenicoli: cloramfenicolo 30 µg (OXOID).

Il cloramfenicolo è stato incluso nel *panel* benché la sua somministrazione agli animali da macello sia vietata in Europa dal 1994, proprio per valutare la sensibilità di *Campylobacter* spp. nei confronti di antimicrobici non più utilizzati.

I risultati degli antibiogrammi sono stati interpretati seguendo le indicazioni fornite dal *Clinical and Laboratory Standards Institute* (2007) e analizzati statisticamente mediante il test del chi-quadrato (χ^2) e il test esatto di Fisher.

RISULTATI

Isolamento e identificazione

Microrganismi appartenenti al genere *Campylobacter* sono stati isolati in tutti e tre i gruppi esaminati. Il gruppo A è risultato positivo al campionamento effettuato al 14° giorno di età degli animali, mentre negli altri due gruppi (B e C) il primo riscontro di *Campylobacter* spp. è avvenuto al campionamento effettuato al 91° giorno d'età degli animali. Fin dal primo isolamento, in tutti e tre i gruppi la maggior parte dei *pool* era positiva (gruppo A: 85%; gruppo B: 85%; gruppo C: 90%), con un andamento che si è mantenuto pressoché costante fino alla fine del ciclo produttivo. Gli isolati sono stati identificati come *C. jejuni* e *C. coli*, con entrambe le specie presenti nei gruppi A e B, e la presenza esclusiva di *C. jejuni* nel gruppo C. Inoltre, nel gruppo A è stata rilevata la predominanza di *C. coli* all'inizio (14 gg.) e alla fine del ciclo produttivo (56, 70, 82 gg.), mentre nel gruppo B questa specie è comparsa solo nell'ultimo campionamento (133 gg.) e con un numero di isolati molto limitato. I risultati dell'isolamento e dell'identificazione di specie sono riportati in dettaglio nella Tabella 2.

Tipizzazione molecolare

Dei 62 ceppi isolati dagli animali vivi e sottoposti a caratterizzazione molecolare, 32 provenivano dal gruppo A, 20 dal gruppo B e 10 dal gruppo C. La selezione degli isolati è stata fatta in modo da analizzare da 4 a 5 ceppi per campionamento positivo in ciascun gruppo.

Dall'elaborazione dei profili RAPD-PCR ottenuti è risultato il dendrogramma riportato in Figura 1. Con un livello di similarità del 50%, scelto arbitrariamente per definire le specie, sono stati individuati due *cluster* principali, uno dei quali

raggruppa gli isolati identificati come *C. jejuni*, mentre l'altro raggruppa gli isolati di *C. coli*. Poiché il valore di riproducibilità della RAPD-PCR (ottenuto mediante ripetizione dell'analisi su ceppi di riferimento) è risultato pari all'87%, gli isolati con un livello di similarità inferiore all'87% sono stati considerati differenti. Complessivamente sono stati ottenuti 9 profili di amplificazione (indice di diversità $D=0,83$): 7 nell'ambito degli isolati di *C. jejuni* e 2 nell'ambito di *C. coli*. Considerando separatamente i ceppi isolati in ciascun gruppo di tacchini, nel gruppo A sono stati rilevati 7 diversi profili RAPD-PCR (tra 32 ceppi isolati in 7 momenti diversi del ciclo produttivo), mentre sia nel gruppo B (tra 20 ceppi isolati in 4 campionamenti) che nel gruppo C (tra 10 ceppi isolati in 2 campionamenti) ne sono stati rilevati 3.

L'analisi di sequenza della *short variable region* (SVR) del gene *flaA* ha rilevato una differenza genetica tra gli isolati maggiore rispetto a quella rilevata mediante RAPD-PCR (indice di diversità $D=0,92$). Dal confronto delle sequenze nucleotidiche (476 nucleotidi) è stato ottenuto il dendrogramma riportato nella Figura 2, dove si osservano 14 diversi profili tra i ceppi analizzati. A differenza di quanto riscontrato tramite RAPD-PCR, gli isolati appartenenti alla stessa specie non sempre rientrano nello stesso *cluster flaA* (in figura 2 i *cluster* nei quali sono presenti sia *C. jejuni* che *C. coli* sono affiancati da una linea verticale). Nel gruppo A, dove sono stati identificati 8 diversi profili *flaA*, solo uno è persistito durante la gran parte del ciclo produttivo, mentre nei gruppi B e C non è stato riscontrato alcun genotipo conservato. La comparazione delle sequenze ottenute con quelle presenti nel database *flaA*-SVR della Oxford University (costruito su una regione di 321 nucleotidi) ha permesso di rilevare la presenza di 13 varianti alleliche (14, 16, 17, 21, 23, 34, 67, 260, 287, 597, 717, 770, 1124), con una maggiore frequenza dei genotipi 14 e 260. Le sequenze di tre genotipi (597, 717, 770) presentavano un'identità del 99,7% con quelle presenti nel database *flaA*, pertanto potrebbero essere delle nuove varianti. I 13 genotipi identificati codificavano per 8 peptidi diversi (1, 2, 5, 8, 10, 11, 12, 220), con la predominanza dei tipi 1, 11 e 8.

Valutazione della sensibilità agli antimicrobici

Sono stati sottoposti ad antibiogramma 54 isolati: 30 del gruppo A (15 *C. jejuni* e 15 *C. coli*), 16 del gruppo B (14 *C. jejuni* e 2 *C. coli*) e 8 del gruppo C (tutti *C. jejuni*, essendo l'unica specie isolata in questo gruppo). La prevalenza della sensibilità e della resistenza da parte dei ceppi esaminati è riportata nella Tabella 3.

Dall'analisi è emersa una notevole resistenza ai fluorochinoloni in tutti i gruppi (dall'83% al 90% dei ceppi resistenti nel gruppo A, dal 63% all'87,5% nel gruppo B, 100% nel gruppo C), mentre sono state riscontrate delle differenze statisticamente significative ($p<0,05$) tra i gruppi nella sensibilità all'acido nalidixico. Infatti, nel gruppo A il 90% dei ceppi era resistente, mentre nei gruppi B e C una metà dei ceppi era sensibile, l'altra metà resistente. La resistenza è prevalsa anche nei confronti dell'associazione sulfametossazolo+trimethoprim (97% dei ceppi resistenti nel gruppo A, 87,5% nel gruppo B, 100% nel gruppo C) e dell'ossitettraciclina (93% dei ceppi resistenti nel gruppo A, 62,5% nel gruppo B, 100% nel gruppo C). Al contrario, il 100% degli isolati era sensibile al cloramfenicolo, e una spiccata sensibilità è stata riscontrata anche nei confronti degli aminoglicosidi (dal 97% al 100% dei ceppi sensibili nel gruppo A, 100% nei gruppi B e C), della clindamicina

(80% dei ceppi sensibili nel gruppo A, 100% nei gruppi B e C) e dei macrolidi (83% dei ceppi sensibili nel gruppo A, 100% nei gruppi B e C). Per quanto riguarda gli antibiotici beta-lattamici, la maggior parte degli isolati testati è risultata resistente all'ampicillina (93% dei ceppi resistenti nel gruppo A, 75% nel gruppo B, 100% nel gruppo C), e la totalità dei ceppi era resistente a cefalotina, ceftiofur e cefuroxime. La resistenza è prevalsa anche nei confronti del cefotaxime nel gruppo A (73% dei ceppi resistenti) e nel gruppo C (87,5% dei ceppi resistenti), mentre nel gruppo B gli isolati testati hanno mostrato un profilo differente nei confronti di questa molecola: il 50% era sensibile, il 31% intermedio e il 19% resistente. Tuttavia tale differenza tra i gruppi di tacchini nella sensibilità al cefotaxime non si è rivelata statisticamente significativa ($p>0,05$). Infine, una sensibilità elevata è stata riscontrata anche nei confronti dell'associazione amoxicillina+acido clavulanico (86,6% dei ceppi sensibili nel gruppo A, 100% nei gruppi B e C).

Il profilo di sensibilità agli antimicrobici dei ceppi di *C. jejuni* è risultato simile a quello di *C. coli*. Inoltre, è stata riscontrata multi-resistenza in tutti gli isolati: nei confronti di un minimo di 4 fino ad un massimo di 15 antimicrobici in *C. jejuni* (da 7 a 15 nel gruppo A, da 4 a 11 nel gruppo B, da 10 a 11 nel gruppo C), nei confronti di un minimo di 3 fino ad un massimo di 15 antimicrobici in *C. coli* (da 3 a 15 nel gruppo A; 7 nel gruppo B).

DISCUSSIONE

Il monitoraggio ha rilevato una notevole diffusione dell'infezione da *Campylobacter* termofili nei tacchini da carne, con positività in tutti e tre i gruppi esaminati. L'assenza dell'infezione negli animali di un giorno d'età avvalorava l'ipotesi circa l'assenza di trasmissione verticale dell'infezione da *Campylobacter* termofili, come già riportato in studi svolti nei broiler (Callicot *et al.*, 2006; Petersen *et al.*, 2001). Il fatto che l'infezione si sia instaurata nei gruppi in due momenti notevolmente diversi, molto precocemente (14 giorni di vita degli animali) nel gruppo A e tardivamente (91 giorni) nei gruppi B e C, può essere ricondotto alla diversa stagione nella quale sono state svolte le indagini. Il monitoraggio del primo gruppo è, infatti, iniziato a tarda estate e si è concluso ad autunno del 2009, periodo nel quale le temperature ambientali erano molto miti. Al contrario, i monitoraggi degli altri due gruppi sono iniziati e si sono svolti per la gran parte durante i successivi mesi invernali, particolarmente rigidi, e gli animali hanno positivizzato solo quando le temperature ambientali sono aumentate (alla fine di aprile 2010). L'influenza stagionale sulla contaminazione da *Campylobacter* spp., dipendente dalla temperatura ambientale, è stata rilevata anche in numerosi studi svolti in allevamenti di broiler, nei quali è stato osservato un picco dell'infezione nei mesi estivi (EFSA, 2010b). Pur non essendoci riscontri di questo tipo riguardanti i tacchini, dagli studi svolti fino ad oggi in questa specie avicola è emersa una notevole variabilità nell'età di positivizzazione degli animali. Ci sono segnalazioni di positivizzazione durante la prima settimana del ciclo produttivo (Wallace *et al.*, 1998), ma anche durante la seconda (Scupham, 2009), la terza (Kiess *et al.*, 2007; Scupham, 2009), ed anche tra la quarta e la nona e tra la nona e la diciottesima settimana (Thorsness *et al.*, 2008).

Il rilievo di un'elevata percentuale di campioni positivi fin dal primo instaurarsi dell'infezione, che è persistita durante tutto il ciclo produttivo in tutti i gruppi, dimostra la rapida diffusione di *Campylobacter* spp. tra gli animali una volta

entrato nel gruppo, che è favorita dall'elevata densità di animali presenti in ciascun capannone. Una così notevole prevalenza dell'infezione da *Campylobacter* nei tacchini è stata talvolta associata ad un'aumentata incidenza di disturbi enterici negli animali (Wallace *et al.*, 1998), mentre nel corso di questi monitoraggi non sono stati osservati segni di diarrea nei gruppi. Inoltre non sono state riscontrate differenze nella prevalenza dell'infezione in relazione al sesso degli animali, contrariamente a quanto osservato da Keiss (2001), che aveva invece rilevato una maggiore positività a *Campylobacter* termofili nei tacchini maschi.

Le differenze nella prevalenza di *C. jejuni* e *C. coli* nei gruppi, così come la presenza esclusiva di *C. jejuni* nel gruppo B, confermano le notevoli differenze nella distribuzione delle due specie batteriche all'interno degli allevamenti e dei singoli gruppi di animali (Lee *et al.*, 2005). Inoltre, un'alternanza nella dominanza dell'una o dell'altra specie durante lo stesso ciclo produttivo, così come il prevalere di *C. coli* all'esordio dell'infezione, rilevato nel gruppo A, sono state osservate anche da Scupham (2009).

Dalla caratterizzazione molecolare degli isolati è emersa una notevole biodiversità sia tra i gruppi, sia all'interno di ciascuno di essi. In tutti i gruppi è stata osservata la scomparsa di alcuni genotipi e la comparsa di nuovi con il progredire del ciclo produttivo. Solo in un gruppo (A) un genotipo è persistito per la gran parte del ciclo. Il cambiamento della popolazione di *Campylobacter* durante il ciclo produttivo, con la comparsa di nuovi genotipi e la scomparsa dei precedenti, è stato osservato anche da Wallace *et al.* (1998) durante il monitoraggio di due gruppi di tacchini. L'analisi mediante RAPD-PCR ha rilevato una maggiore biodiversità tra gli isolati di *C. jejuni* rispetto a quelli di *C. coli*, coerentemente con quanto già emerso da studi nei quali sono stati esaminati ceppi isolati da diverse specie animali e dall'uomo, che hanno rilevato una maggiore diversità genetica negli isolati di *C. jejuni* rispetto a quelli di *C. coli* (Aquino *et al.*, 2010; Zorman *et al.*, 2006). Anche la predominanza del peptide di tipo 1, tra quelli codificati dalle varianti alleliche identificate mediante analisi di sequenza della *short variable region* del gene *flaA*, ha un riscontro in letteratura. Esso era, infatti, il peptide più frequentemente rilevato in uno studio nel quale erano stati esaminati ceppi di origine umana e avicola (Wassenaar *et al.*, 2008).

Dal confronto tra RAPD-PCR e analisi di sequenza della *short variable region* del gene *flaA*, è emersa una maggiore capacità discriminante della seconda metodica (D=0,83 per RAPD-PCR; D=0,92 per sequenziamento SVR-*flaA*). Ciò si spiega con il fatto che la RAPD-PCR ha come *target* l'intero genoma, mentre nell'analisi di sequenza della *short variable region* del gene *flaA* si esamina una porzione di un singolo gene. La RAPD-PCR appare comunque una metodica adatta per rilevare la biodiversità tra gli isolati, ma al fine di ottenere informazioni sulla clonalità degli stessi è più adeguata l'analisi di sequenza della *short variable region* del gene *flaA*. Complessivamente, l'uso combinato di queste due metodiche si è dimostrato uno strumento valido, e allo stesso tempo pratico e relativamente economico, per tipizzare isolati di *Campylobacter* spp.

I test di sensibilità agli antimicrobici hanno messo in luce una notevole multi-resistenza, con tutti gli isolati resistenti ad almeno tre molecole. Inoltre, la maggior parte di essi era resistente alla gran parte degli antimicrobici testati, tra i quali alcuni tra i più utilizzati nella terapia della campilobatteriosi umana: i fluorochinoloni, farmaci di prima scelta, e le tetracicline, di seconda scelta. Questo dato è piuttosto allarmante se si considera

che questi microrganismi antibiotico-resistenti sono stati isolati da animali destinati al consumo umano e che la trasmissione di *Campylobacter* spp. dalle specie *reservoir* all'uomo avviene per via alimentare. È stata inoltre rilevata una notevole resistenza all'ampicillina e alle cefalosporine, che tuttavia non desta sorpresa, in quanto è noto che la maggior parte dei ceppi di *C. jejuni* e *C. coli* è intrinsecamente resistente alle betalattamine (Aarestrup *et al.*, 2008). Al contrario, il rilievo di una notevole sensibilità ai macrolidi è un dato piuttosto inatteso, considerando le numerose evidenze in base alle quali è stato ipotizzato che i ceppi di *Campylobacter* spp. albergati dai tacchini siano più frequentemente resistenti ai macrolidi e ai fluorochinoloni rispetto a quelli che colonizzano i broiler (Ge *et al.*, 2003; Luangtongkum *et al.*, 2006). Questo dato è confortante, in quanto i macrolidi, come i fluorochinoloni, rappresentano la prima linea di difesa nei confronti delle infezioni umane da *Campylobacter* spp. Per quanto riguarda gli aminoglicosidi, nei confronti dei quali la quasi totalità dei ceppi testati era sensibile, i riscontri relativi alla streptomicina sono in contrasto con quanto riportato da altri studi svolti nel tacchino (Gu *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2005). Erano, infatti, state rilevate percentuali di resistenza da moderata a elevata, mentre tutti i ceppi testati in questo studio erano sensibili alla streptomicina. Complessivamente il profilo di antibiotico-sensibilità si è mantenuto costante durante tutto il ciclo produttivo e non sono state rilevate differenze statisticamente significative tra i gruppi di tacchini, così come tra *C. jejuni* e *C. coli*. Quest'ultimo dato è in contrasto con le numerose evidenze circa la maggiore diffusione dell'antibiotico-resistenza (soprattutto nei confronti di alcuni antimicrobici) in *C. coli* rispetto a *C. jejuni* (D'lima *et al.*, 2007; EFSA, 2009).

CONCLUSIONI

Questo studio, l'unico di questo tipo svolto fino ad ora in Italia, ha contribuito ad aumentare le informazioni, ad oggi ancora scarse e frammentarie, sulla diffusione e la sensibilità agli antimicrobici di *Campylobacter* termofili nel tacchino. La necessità di svolgere indagini epidemiologiche a riguardo deriva dal crescente consumo di carne di tacchino e dal rilevante ruolo svolto da questa specie avicola nella trasmissione dell'infezione all'uomo. I dati da noi ottenuti mostrano una notevole diffusione dell'infezione e il persistere della stessa durante tutto il ciclo produttivo, con conseguente macellazione di animali infetti. L'infezione è provocata sia da *C. jejuni* che da *C. coli* (con differenze tra i gruppi), con notevole biodiversità tra le specie ed anche nell'ambito della stessa specie batterica. Anche l'antibiotico-resistenza sembra essere molto diffusa, sia in *C. jejuni* che in *C. coli*, con picchi preoccupanti nei confronti dei fluorochinoloni e delle tetracicline.

Parte dei dati da noi ottenuti è coerente con quanto riportato in letteratura, mentre alcuni riscontri contrastano con le conoscenze attuali, come la confortante elevata sensibilità ai macrolidi da noi rilevata. Sicuramente i dati finora disponibili circa la presenza e l'antibiotico-resistenza di *Campylobacter* spp. nei tacchini non sono ancora sufficienti per chiarire le dinamiche epidemiologiche del microrganismo in questa specie avicola. In particolare, sono necessarie ulteriori indagini atte a identificare la fonte d'infezione in allevamento, per comprendere come il patogeno fa il suo ingresso nei gruppi di animali, ed è inoltre necessario approfondire i meccanismi alla base dello sviluppo di antibiotico-resistenza in *C. jejuni* e *C. coli* isolati dai tacchini, obiettivi che costituiscono sviluppi futuri del presente studio.

BIBLIOGRAFIA

1. Aquino MH, Filgueiras AL, Matos R, Santos KR, Ferreira T, Ferreira MC, Teixeira LM and A Tibana. (2010). Diversity of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* genotypes from human and animal sources from Rio de Janeiro, Brazil. *Res. Vet. Sci.* 88 (2): 214-217.
2. Aarestrup FM, McDermott PF and HC Wegener. (2008). Transmission of antibiotic resistance from animals to humans. In: Nachamkin I, Szymanski CM, Blaser MJ (Eds.), *Campylobacter*, ASM Press, Washington, DC, pp. 645-665.
3. AAVV. (2008). *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *OIE Terrestrial Manual*, Chapter 2.9.3., pp. 1185-1191.
4. Andrighetto C, Knijff E, Lombardi A, Torriani S, Vancanneyt M, Kesters K, Swings J and F Dellaglio (2001). Phenotypic and genetic diversity of enterococci isolated from Italian cheeses. *J. Dairy Res.* 68: 303-316.
5. Barbier N, Saulnier P, Chachaty E, Dumontier S and A Andremont. (1996). Random Amplified Polymorphic DNA typing versus Pulsed-Field Gel Electrophoresis for epidemiological typing of vancomycin-resistant enterococci. *J. Clin. Microbiol.* 34: 1096-1099.
6. Bauer AW, Kirby WMM, Sherris JC and M Turck. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Techn. Bull. Regist. Med. Technol.* 36:493-496.
7. Callicott KA, Friethriksdóttir V, Reiersen J, Lowman R, Bisailon JR, Gunnarsson E, Berndtson E, Hielt KL, Needleman DS and NJ Stern. (2006). Lack of evidence for vertical transmission of *Campylobacter* spp. in chickens. *Appl. Environ. Microbiol.* 72 (9): 5794-5798.
8. CLSI (2007). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Seventeenth Informational Supplement M100-S17.
9. D'lima CB, Miller WG, Mandrell RE, Wright SL, Siletzky RM, Carver DK and S Kathariou. (2007). Clonal population structure and specific genotypes of multidrug-resistant *Campylobacter coli* from Turkeys. *Appl. Environ. Microbiol.* 73 (7): 2156-2164.
10. EFSA (2007). Report including a proposal for a harmonized monitoring scheme of antimicrobial resistance in *Salmonella* in fowl (*Gallus gallus*), turkeys, and pigs and *Campylobacter jejuni* and *C. coli* in broilers. *The EFSA Journal.* 96: 1-46.
11. EFSA (2009). Joint Opinion on antimicrobial resistance (AMR) focused on zoonotic infections. Scientific Opinion of the European Centre for Disease Prevention and Control; Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards; Opinion of the Committee for Medicinal Products for Veterinary Use; Scientific Opinion of the Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks. *The EFSA Journal.* 7 (11): 1372.
12. EFSA (2010a). The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and food-borne outbreaks in the European Union in 2008. *The EFSA Journal.* 1496.
13. EFSA (2010b). Analysis of the baseline survey on the prevalence of *Campylobacter* in broiler batches and of *Campylobacter* and *Salmonella*

- on broiler carcasses, in the EU, 2008; Part B: Analysis of factors associated with *Campylobacter* colonisation of broiler batches and with *Campylobacter* contamination of broiler carcasses; and investigation of the culture method diagnostic characteristics used to analyse broiler carcass samples. *The EFSA Journal*. 8 (8): 1522.
14. Ge B, White DG, McDermott PF, Girard W, Zhao S, Hubert S and J Meng. (2003). Antimicrobial-resistant *Campylobacter* species from retail raw meats. *Appl. Environ. Microbiol.* 69 (5): 3005-3007.
 15. Gu W, Siletzky RM, Wright S, Islam M and S Kathariou. (2009). Antimicrobial susceptibility profiles and strain type diversity of *Campylobacter jejuni* isolates from turkeys in eastern North Carolina. *Appl. Environ. Microbiol.* 75 (2): 474-482.
 16. Huey B and J Hall. (1989). Hypervariable DNA fingerprinting in *Escherichia coli*. Minisatellite probe from bacteriophage M13. *J. Bacteriol.* 171: 2528–2532.
 17. Hunter PR. (1990). Reproducibility and indices of discriminatory power of microbial typing methods. *J. Clin. Microbiol.* 28: 1903-1905.
 18. Keiss A. (2001). *Campylobacter* detection in turkey flocks. M.S. Thesis, West Virginia University, Morgantown.
 19. Kiess AS, Kenney PB and RR Nayak. (2007). *Campylobacter* detection in commercial turkeys. *Br. Poult. Sci.* 48 (5): 567-572.
 20. Lee BC, Reimers N, Barnes HJ, D’Lima C, Carver D and S Kathariou. (2005). Strain persistence and fluctuation of multiple-antibiotic resistant *Campylobacter coli* colonizing turkeys over successive production cycles. *Foodborne Pathog. Dis.* 2 (1): 103-110.
 21. Levesque S, Frost E, Arbeit RD and S. Michaud. (2008). Multilocus sequence typing of *Campylobacter jejuni* isolates from humans, chickens, raw milk, and environmental water in Quebec, Canada. *J. Clin. Microbiol.* 46: 3404-3411.
 22. Luangtongkum T, Morishita TY, Ison AJ, Huang S, McDermott PF and Q Zhang. (2006). Effect of conventional and organic production practices on the prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter* spp. in poultry. *Appl. Environ. Microbiol.* 72 (5): 3600-3607.
 23. Petersen L, Nielsen EM and SL On. (2001). Serotype and genotype diversity and hatchery transmission of *Campylobacter jejuni* in commercial poultry flocks. *Vet. Microbiol.* 82: 141-154.
 24. Rosef O, Gondrosena B and G Kapperuda. (1984). *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* as surface contaminants of fresh and frozen poultry carcasses. *Int. J. Food Microbiol.* 1 (4): 205-215.
 25. Scupham AJ. (2009). *Campylobacter* colonization of the turkey intestine in the context of microbial community development. *Appl Environ Microbiol.* 75 (11): 3564-3571.
 26. Thorsness JL, Sherwood JS, Danzeisen GT, Doetkott C and CM Logue. (2008). Baseline *Campylobacter* prevalence at a new turkey production facility in North Dakota. *J. Food. Prot.* 71 (11): 2295-2300.
 27. Wallace JS, Stanley KN and K Jones. (1998). The colonization of turkeys by thermophilic campylobacters. *J. Appl. Microbiol.* 85 (2): 224-230.

28. Wassenaar TM, Fernandez-Astorga A, Alonso R, Marteinson VT, Magnusson SH, Kristoffersen AB and M Hofshagen. (2009). Comparison of *Campylobacter fla*-SVR genotypes isolated from humans and poultry in three European regions. *Lett. Appl. Microbiol.* 49: 388-395.
29. Yamazaki-Matsune W, Taguchi M, Seto K, Kawahara R, Kawatsu K, Kumeda Y, Kitazato M, Nukina M, Misawa N and T Tsukamoto. (2007). Development of a multiplex PCR assay for identification of *Campylobacter coli*, *Campylobacter fetus*, *Campylobacter hyointestinalis* subsp. *hyointestinalis*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter lari* and *Campylobacter upsaliensis*. *J. Med. Microbiol.* 56 (11): 1467-1473.
30. Zorman T, Heyndrickx M, Uzunović-Kamberović S and S Smole Mozina. (2006). Genotyping of *Campylobacter coli* and *C. jejuni* from retail chicken meat and humans with campylobacteriosis in Slovenia and Bosnia and Herzegovina. *Int. J. Food. Microbiol.* 110 (1): 24-33.

Tabella 1. Principali informazioni riguardanti i gruppi di animali monitorati.

Gruppi	N° capannoni per allevamento	N° animali per gruppo	Sesso	Data accasamento	Data carico	Durata ciclo (giorni)
A	1	8.000	F	24/09/2010	03/12/2009	82
B	3	3.400	M	20/01/2010	08/06/2010	139
C	2	6.000	F	22/01/2010	11/05/2010	109

Tabella 2. Risultati dell'isolamento e dell'identificazione di specie degli isolati.

Gruppo	Età animali	Positività	Specie	
			<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>
Gruppo A	14 gg.	85%	11,8%	88,2%
	21 gg.	90%	59,1%	40,9%
	28 gg.	90%	56,5%	43,5%
	42 gg.	85%	63,2%	36,8%
	56 gg.	100%	45%	55%
	70 gg.	95%	30%	70%
	82 gg.	75%	47,4%	52,6%
Gruppo B	91 gg.	85%	100%	0%
	105 gg.	100%	100%	0%
	119 gg.	90%	100%	0%
	133 gg.	75%	87%	13%
Gruppo C	91 gg.	90%	100%	0%
	105 gg.	100%	100%	0%

Tabella 3. Risultati dei test di sensibilità agli antimicrobici.

Classe	Principio attivo	Sensibile			Intermedio			Resistente		
		Gruppo A	Gruppo B	Gruppo C	Gruppo A	Gruppo B	Gruppo C	Gruppo A	Gruppo B	Gruppo C
Aminoglicosidi	Apramicina	100%	100%	100%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
	Gentamicina	97%	100%	100%	0%	0%	0%	3%	0%	0%
	Streptomicina	100%	100%	100%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
Cefalosporine	Cefalotina	0%	0%	0%	0%	0%	0%	100%	100%	100%
	Cefotaxime	0%	50%	0%	27%	31%	12,5%	73%	19%	87,5%
	Ceftiofur	0%	0%	0%	0%	0%	0%	100%	100%	100%
	Cefuroxime	0%	0%	0%	0%	0%	0%	100%	100%	100%
Penicilline	Ampicillina	7%	25%	0%	0%	0%	0%	93%	75%	100%
	Amoxicillina +Acido clavulanico	86,6%	100%	100%	6,7%	0%	0%	6,7%	0%	0%
Chinoloni	Acido nalidixico	10%	50%	50%	0%	0%	0%	90%	50%	50%
	Flumequina	10%	12,5%	0%	0%	0%	0%	90%	87,5%	100%
	Enrofloxacina	10%	31%	0%	7%	6%	0%	83%	63%	100%
	Ciprofloxacina	10%	12,5%	0%	0%	0%	0%	90%	87,5%	100%
Lincosamidi	Clindamicina	80%	100%	100%	3%	0%	0%	17%	0%	0%
Macrolidi	Eritromicina	83%	100%	100%	0%	0%	0%	17%	0%	0%
	Tilmosina	83%	100%	100%	0%	0%	0%	17%	0%	0%
	Tilosina	83%	100%	100%	0%	0%	0%	17%	0%	0%
Sulfamidici +diaminopirimidine	Sulfametossazolo +Trimethoprim	3%	12,5%	0%	0%	0%	0%	97%	87,5%	100%
Tetraciline	Ossitetraciclina	7%	37,5%	0%	0%	0%	0%	93%	62,5%	100%
Fenicoli	Cloramfenicolo	100%	100%	100%	0%	0%	0%	0%	0%	0%

Figura 1. Dendrogramma ottenuto dall'elaborazione dei profili RAPD-PCR.

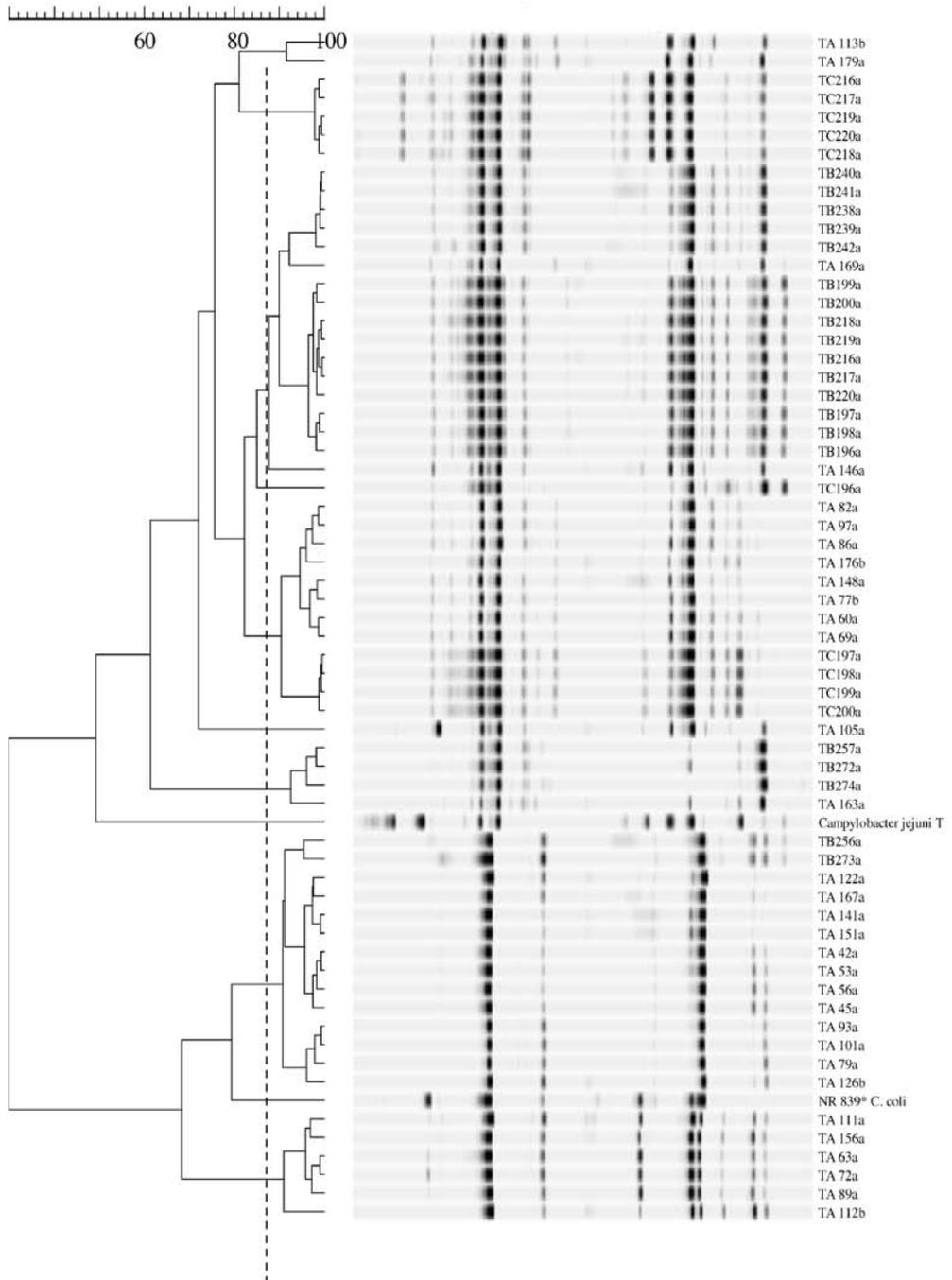


Figura 2. Dendrogramma ottenuto dal confronto delle sequenze nucleotidiche codificanti per la *short variable region* del gene *flaA*.

