

## COMUNICAZIONE 2

### TIPIZZAZIONE DI CEPPI DI *CAMPYLOBACTER JEJUNI* ISOLATI IN ALLEVAMENTI DI GALLINE OVAIOLE DELL'ITALIA MERIDIONALE

G. DI MODUGNO<sup>1</sup>, A. PARISI<sup>2</sup>, A. CAMARDA<sup>1</sup>, F. CAPUANO<sup>3</sup>, D. DI MODUGNO<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Sanità e Benessere degli Animali, Sezione di patologia Aviare, Università degli Studi di Bari

<sup>2</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Puglia e Basilicata, Foggia

<sup>3</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno, Portici (NA)

Parole chiave: *Campylobacter jejuni*, tossinfezioni alimentari, tipizzazione genetica, PCR-RFLP

#### Typing of *Campylobacter jejuni* isolated from laying hens breeding in South Italy

Key words: *Campylobacter jejuni*, food poisoning, molecular typing, PCR-RFLP

Summary: *Campylobacter jejuni* isolated from cloacal swabs of laying hens in three intensive breeding of South Italy have been biotyped according Lior (1984) and genotyped with *flaA* PCR-RFLP (Nachamkin, *et al.* 1993). The average rate of isolation of *C. jejuni* was 34,37%, in farm A, and 33,34% and 64,26% respectively in the breeding B and C. The biotyping showed in all the breeding the contemporaneous presence of biotypes 1 and 2. The first one prevailed in the farm A (55,55%), the second in the farm B and C (53,84% and 57,14% respectively). The biotype 1 have a particular epidemiological importance because associated with human enteritis. The genotyping revealed a great discriminating power of the biotyping. The PCR-RFLP showed 9 different profiles *HinfI/DdeI*, 3 in the breeding A (1/1, 2/3, 2/2) and B (1/4, 3/5, 2/6) and 4 (1/4, 3/7, 1/8, 1/9) in the farm C. Nevertheless in every one flock it seems prevailing a single genetic profile.

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

#### Introduzione

*Campylobacter (C.) jejuni* viene riconosciuto tra gli agenti più frequentemente coinvolti come causa di tossinfezioni alimentari nell'uomo (7). Il pollame è considerato il serbatoio principale del germe, le cui caratteristiche biologiche e genetiche sono ancora oggi scarsamente conosciute. Si è ritenuto, pertanto, di effettuare ricerche sulla tipizzazione di ceppi *C. jejuni* isolati in allevamenti intensivi di galline ovaiole. I germi sono stati biotipizzati secondo la metodica di Lior (3) e sottoposti a PCR-RFLP della flagellina A.

#### Materiali e metodi

Campionamento ed isolamento dei *C. jejuni*. Le ricerche sono state condotte in 3 allevamenti intensivi di galline ovaiole per la produzione di uova da consumo situate rispettivamente in provincia di Bari (Aziende A e B) ed in provincia di Salerno (Azienda C). Gli animali erano stati introdotti in azienda a 120 giorni di vita, e provenivano, quelli dell'azienda A da Asti, quelli dell'azienda B da Crotone e quelli dell'azienda C da Forlì. Il campionamento è stato effettuato dalle galline ovaiole in deposizione scelte a *random* nel capannone. In totale sono stati eseguiti n.70 tamponi cloacali: n.32 nell'azienda A, n. 24 nell'azienda B e n. 14 nell'azienda C. Per la raccolta dei campioni, la coltivazione, l'isolamento e l'identificazione del *C. jejuni* sono state utilizzate le metodiche descritte da Di Modugno *et al* (3)

#### Tipizzazione biologica di *C. jejuni* secondo Lior

Sono stati sottoposti a tipizzazione biologica secondo Lior (4) n.28 ceppi di *C. jejuni* isolati dalle Aziende A (8 ceppi isolati da sette animali diversi), B (13 ceppi isolati da sei animali diversi), C (7 ceppi isolati da sei animali diversi).

#### Tipizzazione genetica di *C. jejuni*

I ceppi isolati sono stati sottoposti a tipizzazione mediante PCR – RFLP della flagellina A secondo la metodica descritta da Nachamkin *et al* (7). Sono stati impiegati i seguenti primers:

A1: 5' -GGA TTT CGT ATT AAC ACA AAT GGT GC – 3'

A2: 5' –CTG TAG TAA TCT TAA AAC ATT TTG – 3'

La Restriction Fragment Length Polimorfism (RFLP) è stata attuata effettuando una digestione separata con gli enzimi di restrizione *HinfI* e *DdeI* (10 UI) degli amplificati, separati successivamente mediante elettroforesi in gel di agarosio (2% p/v di Nusieve, più 0,65% di agarosio) a 90 V per 90 minuti.

A ciascun profilo RFLP è stato assegnato un valore numerico sulla base dei pattern di restrizione ottenuti rispettivamente con gli enzimi *HinfI* e *DdeI* e in accordo a quanto descritto da Ayling *et al.* (1).

#### Risultati

*Campylobacter jejuni* è stato isolato da tutti e tre gli allevamenti sottoposti a campionamento.

Nell'allevamento A la positività media dei tamponi era del 34,37%, in quello B del 33,34% e nell'allevamento C del 64,26%. La biotipizzazione degli stipiti batterici isolati consentiva l'individuazione dei soli biotipi 1 e 2 presenti in tutti e tre gli allevamenti. I biotipi 3 e 4 non sono mai stati riscontrati. Il biotipo 1 costituiva mediamente il 48,27% degli stipiti; il biotipo 2 rappresentava invece il restante 51,72%. Quest'ultimo, inoltre, prevaleva nelle aziende B e C dove raggiungeva percentuali del 53,84% e 57,14%. Il tipo 1 invece era maggiormente presente nell'allevamento A (55,55%). La PCR degli stipiti isolati consentiva di individuare, in tutti i ceppi testati, la banda attesa di precipitazione di circa 1700 pb tipica del *Campylobacter jejuni*. La successiva restrizione dell'amplificato con gli enzimi *HinfI* e *DdeI* consentiva di individuare ben 9 differenti profili (tabella 1), distribuiti: 3 nell'azienda A (profilo 1/1, 2/2, 2/3), 3 nell'azienda B (1/4, 3/5, 2/6) e 4 (1/4, 3/7, 1/8, 1/9) in quella C. Il confronto tra biotipizzazione e *flaA* PCR-RFLP evidenziava la netta mancanza di corrispondenza tra i profili ottenuti con le due metodiche. Non è stato infatti possibile attribuire in maniera univoca a ciascun biotipo, uno o più profili genetici.

#### Discussione

Le ricerche effettuate confermano la presenza costante e consistente del *Campylobacter jejuni* negli allevamenti avicoli intensivi. Le percentuali di

isolamento del germe, risultate mediamente del 40%, sono analoghe a quelle riscontrate da Di Modugno *et al.* (3) i quali, unitamente a Lior (4) ribadivano con la biotipizzazione la prevalenza dell'isolamento dei biotipi 1 e 2. Il biotipo 1 assumerebbe particolare rilievo epidemiologico in quanto più frequentemente associato a pazienti umani affetti da enterite (8). Dalle presenti ricerche si evidenzia, tuttavia, che una più efficace differenziazione dei ceppi di *C. jejuni* isolati non possa essere ottenuta con la biotipizzazione, ma con la tipizzazione genetica utilizzando le due endonucleasi (*Hinf1* e *Dde1*) sullo stesso amplificato. Tale tipizzazione genetica ha consentito di individuare più tipi genetici all'interno di ciascun biotipo e di ciascun allevamento (tab. 1) che non si ripetono se non occasionalmente negli altri due allevamenti presi in esame. Infatti solo il profilo 1,4 è presente contemporaneamente in due aziende. In ciascun gruppo di animali apparirebbe prevalente un singolo profilo genetico (*Hinf1/Dde1*). Infatti nell'allevamento A prevale il profilo 1,1 (*Hinf1/Dde1*), riscontrato in 5 animali su 7 esaminati (71,42%), nell'allevamento B il profilo 1,4 evidenziato in 4 soggetti su 6 (66,67%) e nell'allevamento C il profilo 3,7 in 2 animali su 6 (33,33%).

Dai risultati ottenuti sembrerebbe che la diversa provenienza delle pollastre (Asti, Crotone, Forlì) e l'ubicazione degli allevamenti consentirebbe la colonizzazione di popolazioni di *Campylobacter jejuni* tipiche di ogni gruppo considerato. Resta da chiarire il significato epidemiologico di queste osservazioni. Non è, infatti, ancora noto se a ciascuno stipite di *C. jejuni* sia attribuibile una specifica attività patogena. Considerato, inoltre, che uno stesso tipo genetico, diverso da quelli riscontrati nell'intestino, può essere evidenziato contemporaneamente nell'ovidutto e sulle uova di uno stesso gruppo di ovaiole (2, 3), è

necessario approfondire se ad un dato genotipo è possibile attribuire uno specifico tropismo d'organo. Utili conferme possono derivare dalla standardizzazione ed armonizzazione delle metodiche utilizzate nei vari laboratori per rendere più facilmente confrontabili i risultati ottenuti.

#### Bibliografia

1. Ayling, R.D., Woodward, M.J., Evans, S. and Newell, D.G. (1996). "Restriction fragment length polymorphism of polymerase chain reaction products applied to the differentiation of poultry *Campylobacters* for epidemiological investigations". Res. in Vet. Sci. 60:168-162.
2. Cox N.A., Stern N.J., Hiatt K.L. and Berrang M.E. (1999). "*Campylobacter* passage from hen to offspring through the eggs". PROC. of 34<sup>th</sup> National Meeting on Poultry Health Processing. 20-22 Oct 1999. Ocean City Maryland pag. 6-7.
3. Di Modugno G., Nasti R., Camarda A., Circella E., (2000). Tipizzazione ed antibiotico resistenza di *Campylobacter jejuni* isolati dal contenuto intestinale, ovidutto e guscio di uova da consumo. Sel. Vet. 8-9., 741-750.
4. Lior H. (1984). New extend biotyping scheme for *C. jejuni*, *C. coli* and "*C. lariidis*". J. Clin. Microbiol. 20,1065-1073.
5. Lior, H.D.L. Woodward, J.A. Edgar, L. J. Laroche, and P. Gill. (1982). Serotyping of *C. jejuni* by slide agglutination based on heat-labile antigenic factors. J. Clin. Microbiol. 15:761-768.
6. Nachamkin, I., Bohachick, K. and Patton, C.M. (1993). "Flagellin gene typing of *Campylobacter jejuni* by restriction fragment length polymorphism analysis". J. Clin. Microbiol. 31:1531-1536.
7. Richardson J.F., Frost J.A., Kramer J.M., Thwaites R.T., Bolton F.J., Wareing D.R.A., Gordon J.A. (2001). "Coinfection with *Campylobacter* species: an epidemiological problem?" J. Appl. microbiol. , 91-206-211
8. Varoli O., Montella M.T., La Placa M. jr (1991). Observation made on strains of *Campylobacter* spp. isolated in 1989 in Northern Italy. Microbiology 14,31-35.

**Tabella 1:** Biotipi (Lior, 1984) e profili di restrizione *Hinf1/Dde1* di *C. jejuni* in 3 allevamenti di galline ovaiole.

**Table 1:** Biotypes (Lior, 1984) and *Hinf1/Dde1* profiles of *C. jejuni* isolated from laying hens of 3 three intensive breeding

Allev.	N° stipiti	Profili genetici <i>Hinf1/Dde1</i>		% di frequenza del profilo ( <i>Hinf1/Dde1</i> )	Biotipo	
		N°stipiti	Profilo		1	2
A	8*	5	1,1	62,5	4/5	1/5
		1	2,3	12,5	1/1	0/1
		2	2,2	25	0/2	2/2
B	6	4	1,4	66,67	2/4	2/4
		1	3,5	16,66	1/1	0/1
		1	2,6	16,66	0/1	1/1
C	6	2	1,4	33,33	1/2	1/2
		2	3,7	33,33	1/2	1/2
		1	1,8	16,66	0/1	1/1
		1	1,9	16,66	0/1	1

\*due ceppi isolati da uno stesso animale