

COMUNICAZIONE 14

DIAGNOSI DI LABORATORIO DEL *CAMPYLOBACTER SPP.*: CONFRONTO CRITICO TRA TRE DIFFERENTI TECNICHE

L. Fiorentini, F. Paganelli, R. Leonelli

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Sezione diagnostica di Forlì

Parole chiave: *Campylobacter spp.*, diagnosi, multiplex-PCR, esame colturale, ELFA

Detection of *Campylobacter spp.*: critical comparison among three differens diagnostic methods

Key words: *Campylobacter spp.*, diagnosis, multiplex-PCR, microbiological test, ELFA

Summary. *Campylobacter* is a common foodborne pathogen of humans that has been associated with poultry carcasses and further processed poultry products. Most important is the role of *Campylobacter jejuni* to cause avian vibrionic hepatitis. A comparative studies between microbiological test, immunoenzymatic automated method and multiplex-PCR to detection of *Campylobacter*, was carried out on 52 samples (foods and pathological samples) conferred at diagnostic laboratory of I.Z.S.L.E.R. in Forlì, during 2003.

Correspondence: Laura Fiorentini, Istituto Zooprofilattico della Lombardia ed Emilia Romagna. Sezione diagnostica di Forlì. Via Marchini n.1- 47100 Forlì. E-mail forli@bs.izs.it

Introduzione

Grazie ai progressi ottenuti nelle tecniche d'isolamento ed identificazione, è stato possibile dimostrare l'importanza eziologica dei *Campylobacter* nell'ambito della microbiologia degli alimenti e della sanità animale. *C. coli*, *C. lari* e *C. jejuni* svolgono un ruolo determinante nelle tossinfezioni alimentari, provocano enterite acuta nell'uomo e pur essendo spesso commensali, possono causare malattia in molte specie animali. Sulla base di studi caso-controllo, si presume che la via di infezione sia soprattutto di origine alimentare e che il consumo di carne cruda o poco cotta rappresenti il fattore di rischio principale (5). Il *Campylobacter* è in grado di sopravvivere molti mesi nella carne macinata e nelle carcasse di pollame congelato; sembra anzi sopravvivere meglio in ambienti refrigerati che a temperatura ambiente. La moltiplicazione del batterio richiede invece temperature superiori a 30°C. La temperatura di crescita ottimale è compresa tra i 42° e 47°C. Tuttavia, dal momento che i *Campylobacter* sono ubiquitari a livello ambientale e sono in grado di colonizzare la maggior parte delle specie di interesse zootecnico, l'origine e le modalità di infezioni nell'uomo sono ancora oggetto di discussione. L'esame colturale, immunoenzimatico e la *polymerase chain reaction* (PCR), rappresentano le tecniche di laboratorio attualmente impiegate per l'isolamento ed identificazione dei *Campylobacter* sia nel campo della microbiologia degli alimenti che della sanità animale.

Materiali e metodi

In un periodo di tempo compreso tra gennaio ed agosto 2003, sono stati analizzati 52 campioni; alcuni erano alimenti di origine animale, altri erano costituiti da materiale patologico (fegato, duodeno e ciechi) prelevato in sede autoptica a partire da polli con lesioni riferibili ad epatite vibrionica. Per queste matrici sono state applicate le tecniche sopra menzionate al fine di valutare vantaggi e svantaggi di ciascuna metodica.

Esame colturale

Metodo qualitativo che richiede 4 successivi passaggi (1), (2), (4). A) Arricchimento in terreno liquido selettivo (*Campylobacter Enrichment Broth Modificato*), inoculato con il campione in esame e, dopo omogeneizzazione, incubato in termostato a 42°C per 48 ore. B) Isolamento in piastra su terreni solidi selettivi *Karmali* e *Preston*, incubazione entro un

sistema adatto per microaerofilia in termostato a 42°C per 48 ore. C) Trapianto di colonie sospette (colonie piccole lucide di colore rosa su terreno Preston e colonie piccole pastose biancastre su terreno Karmali) in agar sangue, da incubare in microaerofilia a 42°C per 24 ore. D) Identificazione con colorazione di Gram, prove biochimiche (catalasi, idrolisi dell'ippurato), prove di sensibilità agli antibiotici (acido nalidixico e cefalotina).

Tabella 1: Identificazione dei *Campylobacter*.

Table 1: *Campylobacter* identification

	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. lari</i>
Catalasi	+	+	+
Idrolisi dell'ippurato	+	-	-
Acido nalidixico	S*	S	R
Cefalotina	R**	R	R

*Sensibile **Resistente

Sistema immunoenzimatico (VIDAS[®], BioMerieux, F)

E' un test immunoenzimatico automatizzato che si avvale di anticorpi monoclonali per la ricerca di antigeni del *Campylobacter* con metodo ELFA (*Enzyme Linked Fluorescent Assay*) (6). E' stato sviluppato come metodo di *screening* rapido, consentendo la rilevazione in 48 ore.

Multiplex-PCR

L'estrazione del DNA batterico viene fatta dal terreno di arricchimento dopo 48 ore d'incubazione.

L'estrazione del genoma batterico avviene secondo il protocollo QIAamp DNA mini kit (Qiagen-Hialden®, Germany). Il DNA estratto viene utilizzato direttamente nel saggio della multiplex-PCR applicando la metodica richiesta dalla PlatinumTaqPCR[®] DNAPolymerase (Invitrogen®, USA). Nella multiplex-PCR fungono da innesco alla reazione 3 coppie di *primers* specifiche per i tre *campylobacter* considerati (tab.2). La reazione di amplificazione avviene secondo il seguente profilo: 2 minuti a 94°C, seguiti da 35 cicli costituiti da 3 *step*: 94°C per 30 secondi, 56°C per 30 secondi e 72°C per 30 secondi (3). Il prodotto amplificato viene purificato tramite il *kit* QIAquick PCR Purification (Qiagen-Hialden®, Germany), e sottoposto a corsa elettroforetica in gel di agarosio al 1,5%, con bromuro di etidio e visualizzazione mediante transilluminatore a raggi UV. Quando il campione risulta positivo per il *C.jejuni* si utilizza il DNA estratto per un'ulteriore PCR con *primers* specifici per il gene *Hip* (gene che codifica l'enzima per l'idrolisi dell'ippurato).

Risultati

L'esame colturale su 52 campioni ha permesso di isolare 21 (40%) ceppi di *C. jejuni*, 6 (12%) di *C. lari*, 2 (4%) di *C. coli* e 23 sono risultati negativi. Per quanto riguarda il *C. coli* ed il *C. lari* i risultati sono stati confermati dalla multiplex-PCR, mentre per il *C. jejuni* si sono ottenute 36 (69%) identificazioni positive contro 21 (40%) del metodo colturale. I risultati ottenuti con i metodi ELFA e multiplex-PCR sono sovrapponibili: 44 (85%) positivi, 8 (15%) negativi, con il limite del sistema automatizzato di non tipizzare i campioni positivi. I risultati sono schematizzati nelle figure 1, 2 e 3.

Tabella 2: Sequenza dei primers.

Table 2: Sequence of primers.

PRIMER	SEQUENZA NUCLEOTIDICA	PER
C-1	5' CAATAAGTTAGAGGTAGAATGT 3'	<i>C. jejuni</i>
C-4	5' AGTCGATCGATCACGAATAGG 3'	<i>C. coli</i>
HIP-F	5' GAAGAGGGTTTGGGTGGTG 3'	<i>C. jejuni</i>
HIP-R	5' AGCTAGCTTCGCATAATAACTTG 3'	<i>C. coli</i>
CC18-F	5' GGATGATTTCTACAAAGCGAG 3'	<i>C. coli</i>
CC519-R	5' ATAAAAGACTATCGTCGTG 3'	<i>C. coli</i>
CL-55	5' ATGGAAGTCGAACGATGAAGCGAC 3'	<i>C. lari</i>
CL-632	5' CCACTCTAGATTACCAGTTTCCC 3'	<i>C. lari</i>

Discussione e Conclusioni

Esame colturale

La metodica microbiologica tradizionale consente di ottenere ceppi vivi utili per studi epidemiologici e prove sperimentali. I tempi minimi necessari per l'isolamento e la tipizzazione batterica sono compresi tra 6 e 7 giorni. I batteri devono essere presenti, nei campioni analizzati, vivi e con capacità replicative. Al contrario degli alimenti, i campioni patologici sono spesso fortemente inquinati e ciò può costituire un ostacolo al possibile isolamento dei *Campylobacter*.

Sistema ELFA

E' una tecnica rapida (48 ore) e sensibile; la standardizzazione delle procedure riduce al minimo gli errori legati al fattore uomo. Non consente la tipizzazione batterica (i risultati vengono espressi come positivo/negativo *Campylobacter spp.*); per questo motivo trova utile impiego negli screening preliminari. E' un sistema nato per le esigenze diagnostiche in campo alimentare, quindi altri studi dovranno essere condotti per stabilire la reale utilità nel settore della sanità animale. I risultati fino ad ora ottenuti sono in tal senso incoraggianti.

Multiplex-PCR

E' una tecnica sensibile e specifica in grado di valutare la presenza di *C. coli*, *C. lari* e *C. jejuni* con un'unica analisi in tempi relativamente brevi (72 ore). Per il *C. jejuni*, è possibile ottenere un'ulteriore conferma applicando una seconda PCR finalizzata all'identificazione del gene Hip. Non consente di valutare la capacità replicativa del germe: la presenza del batterio non sempre è indice di malattia nell'ambito della sanità animale né di contaminazioni rilevanti per le tossinfezioni alimentari.

Dai risultati ottenuti si evince che il sistema automatizzato ELFA, nel quale i risultati vengono espressi in negativo/positivo trova miglior campo di applicazione nel settore della microbiologia degli alimenti. Il metodo microbiologico consente in 7 giorni di isolare ed identificare il germe. La multiplex-PCR permette, in un unico step, di identificare e tipizzare il genoma batterico in 72 ore. L'ideale sarebbe poter applicare le tre tecniche contemporaneamente al fine

di ottimizzare i risultati ottenuti sia nel settore della ricerca scientifica che nella routine diagnostica.

Ringraziamenti

Si ringrazia tutto il personale tecnico della sezione diagnostica di Forlì, per la preziosa collaborazione.

Bibliografia

1. Bergey's (1984). Manual of systematic bacteriology. William Wilkins Ed. Baltimore USA 245-249
2. Carter G.R. e Cole J.R. (1990). Diagnostic procedures in veterinary bacteriology and mycology. 5th edition, 61-75.
3. Chuma T., Hashimoto S., Okamoto K. (2000). "Detection of Thermophilic *Campylobacter* from Sparrows by Multiplex PCR: The Role of Sparrows as a Source of Contamination of Broiler with *Campylobacter*". *J. Vet. Med. Sci.* 62 (12): 1291-1295
4. Cocchi M., Massi P., Tosi G., Tamba M. (2001). "Presenza di *Campylobacter spp.* nella carne di pollame macellata in Romagna". *Large Animals Review*, anno 7, numero 8.
5. Newell D.G. (2001). "La sub-tipizzazione del *Campylobacter jejuni* ed il suo utilizzo pratico nelle indagini epidemiologiche delle campilobacteriosi aviare". *Large Animals Review*, anno 7, numero 8.
6. Stern N.J. (2001). "Tracking *Campylobacter spp.* In poultry operation and humans". *La selezione veterinaria* 11: 998-1001.

Figura 1. Esame colturale

Figure 1. Microbiology method

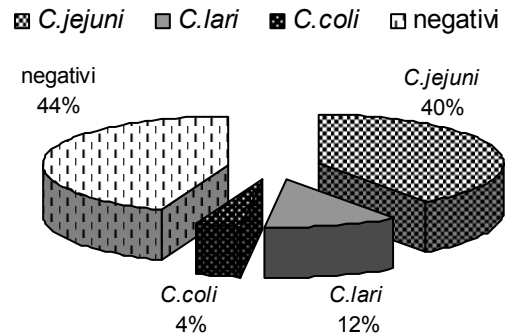


Figura 2. Sistema ELFA

Figure 2. ELFA system

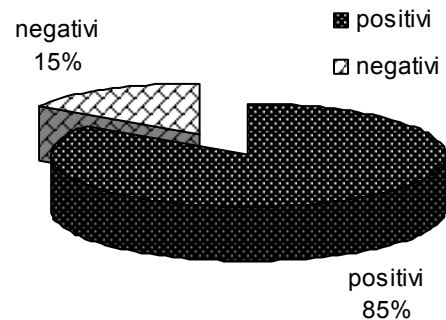


Figura 3. Risultati PCR

Figure 3. PCR data

