

PREVALENZA DI *CAMPYLOBACTER* TERMOTOLLERANTI E RELATIVI FATTORI DI VIRULENZA IN ALZAVOLE (*ANAS CRECCA*)

Dipineto L., Gargiulo A., Sensale M., De Luca Bossa L.M., Russo T.P., Borrelli L., Calabria M., Menna L.F., Fioretti A.

Dipartimento di Patologia e Sanità Animale, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Napoli Federico II

Summary

This study was undertaken with the aim to evaluate the presence of *Campylobacter* spp. and related *cytolethal distending toxin* (*cdt*) genes in common teals (*Anas crecca*). To achieve this goal, cloacal swabs were collected from 70 common teals and analyzed by culture methods and polymerase chain reaction. In addition, *C. jejuni* were examined also for the presence of *wlaN* gene. This is believed to be the first report of *Campylobacter* spp. in common teal and our results confirm the very common occurrence of *C. jejuni* ($n = 40$) and *C. coli* ($n = 13$) in waterfowls. Furthermore, the *cdt* genes were frequently present in both *C. jejuni* and *C. coli* isolated. Moreover, seven *C. jejuni* isolates carried also the *wlaN* gene which is presumably involved in the expression of ganglioside mimics in Guillian-Barré syndrome.

INTRODUZIONE

L'infezione da *Campylobacter* spp., in particolare *C. jejuni* e *C. coli*, è considerata una delle principali cause di tossinfezione alimentare in tutto il mondo. Nonostante la malattia si manifesti in forma moderata e autolimitante, possono verificarsi gravi complicanze post-infettive come la sindrome di Gullain-Barré (Humphrey *et al.*, 2007).

Il pollame è considerato il più importante vettore del *Campylobacter* spp. e agisce come principale fonte d'infezione per l'uomo. Infatti, il consumo di carne di pollame non adeguatamente cotta e la sua manipolazione non corretta sono la principale fonte d'infezione per l'uomo (Lee & Newell, 2006).

Sono stati studiati diversi fattori di virulenza importanti per l'induzione della gastroenterite, come la resistenza ai sali biliari, l'invasione delle cellule epiteliali e la produzione della *cytolethal distending toxin* (CDT) (Van Deun *et al.*, 2007). In particolare la CDT è una tossina codificata da tre subunità geniche chiamate *cdtA*, *cdtB* e *cdtC* (Samosornsuk *et al.*, 2007). CDT induce l'arresto nella fase G2/M del ciclo cellulare delle cellule eucariotiche, impedendo loro di entrare in mitosi, con conseguente morte cellulare (Zilbauer *et al.*, 2008). Inoltre, nell'ultimo decennio, è stato individuato un gene chiamato *wlaN* che è presumibilmente coinvolto nell'espressione della mimica gangliosidica nella sindrome Guillian-Barré (Linton *et al.*, 2000).

I dati in letteratura riguardo la diffusione del *Campylobacter* spp. nell'alzavola (*Anas crecca*) sono carenti. Per ovviare a tale mancanza, il presente studio è stato intrapreso con lo scopo di valutare la prevalenza del *Campylobacter* spp. nell'alzavola, i relativi geni codificanti la *cytolethal distending toxin*, nonché valutare l'eventuale riscontro del gene *wlaN*.

MATERIALI E METODI

Catture e Campionamento

Sono stati raccolti tamponi cloacali da 70 alzavole adulte durante il periodo di svernamento (*i.e.* Gennaio 2009). Questa dimensione del campione è stata calcolata con la formula proposta da Thrusfield (1995) utilizzando i seguenti valori: popolazione oggetto di indagine (circa 1500 alzavole), prevalenza attesa (5%), intervallo di confidenza (95%) e precisione desiderata (5%). Il prelievo è stato effettuato nelle zone umide dell'Oasi WWF di Serre-Persano situata nella parte meridionale della regione Campania. Gli uccelli sono stati catturati mediante l'impiego di *mist-net* e trappole tunnel. Ogni alzavola è stata campionata singolarmente usando un tampone cloacale sterile, marcata con anello e poi rilasciata. Le procedure di inanellamento sono state eseguite dall'Associazione Studi Ornitologici Italia Meridionale (ASOIM). Le procedure di manipolazione degli uccelli sono state eseguite secondo le linee guida dell'*Office of Animal Care and Use*.

Isolamento e identificazione

I tamponi cloacali sono stati inoculati in *Campylobacter selective enrichment broth* (Oxoid Ltd, Milano), incubati a 42°C per 48 ore in condizioni microaerofile fornite dal CampyGen (Oxoid) e processati seguendo la procedura ISO 10272:2006. Le colonie identificate presuntivamente come *Campylobacter* spp., al microscopio ottico, sono state sottoposte alla *polymerase chain reaction* (PCR). L'individuazione specifica del genere *Campylobacter* si basava sull'amplificazione del gene *cadF* utilizzando i primer *cadF2B*, e *cadR1B* come descritto da Konkel *et al.* (1999). Tutti gli estratti di DNA sono stati esaminati, mediante triplex PCR, per valutare le specie *C. jejuni*, *C. coli* e *C. lari* utilizzando i primer e le condizioni di PCR descritti da Khan & Edge (2007). I prodotti sono stati separati mediante elettroforesi su gel di agarosio 1,5% (Gibco-BRL, Milano), colorati con bromuro di etidio e visualizzati sotto luce UV. I campioni positivi per *C. jejuni* e *C. coli* sono stati esaminati anche per la presenza dei geni veicolanti la CDT (*cdtA*, *cdtB*, *cdtC*, e *cdt* cluster) utilizzando i primer e le procedure descritte da Bang *et al.* (2003). Infine, i campioni positivi al *C. jejuni* sono stati esaminati anche per valutare la presenza del gene *wlaN* secondo quanto riportato da Talukder *et al.* (2008).

RISULTATI

Su 70 alzavole esaminate, 42 (60.0%; 95% intervallo di confidenza (CI) = 47.6-71.3%) erano positive a *Campylobacter* spp. Come dimostrato dalla triplex PCR effettuata per identificare la presenza delle specie *C. jejuni*, *C. coli* e *C. lari*, *C. jejuni* sono stati ritrovati in 40 su 42 (95.2%; 95% CI = 82.6 - 99.2%) campioni positivi e *C. coli* sono stati ritrovati in 13 su 42 (30.9%; 95% CI = 18.1 - 47.2%) campioni positivi. Al contrario, *C. lari* non è mai stato ritrovato.

Per quanto riguarda la CDT, tutti i *C. jejuni* isolati veicolavano i geni *cdtA*, *cdtB*, *cdtC* e *cdt* cluster e tutti i *C. coli* isolati veicolavano i geni *cdtB* e *cdt* cluster ad eccezione di tre ceppi di *C. coli* che non veicolavano nessuno dei due geni *cdtA* e *cdtC*. Per quanto riguarda il gene *wlaN* ricercato per *C. jejuni*, sette ceppi veicolavano il gene *wlaN*.

DISCUSSIONE

Le specie aviarie sono considerate il principale serbatoio di questo microrganismo che è stato, infatti isolato sia da uccelli domestici che selvatici ma mai dall'alzavola (Van Dyke *et al.*, 2010). I risultati del presente studio, in cui si è ottenuta una prevalenza di *Campylobacter* spp. del 60%, sono in linea con gli isolamenti effettuati in altri uccelli acquatici segnalati da altri autori (Nonga & Muhairwa, 2010; Colles *et al.* 2008). Per nostra conoscenza, questo è il primo studio che valuta la prevalenza di *Campylobacter* spp. nell'alzavola, confermando, quindi, il ruolo degli uccelli acquatici come vettore di questo patogeno.

Per quanto riguarda la CDT, i nostri risultati confermano l'elevata prevalenza dei geni *cdtA*, *cdtB*, e *cdtC* in *C. jejuni*, dato coerente con i risultati di precedenti studi (Pickett *et al.*, 1996; Martinez *et al.*, 2006). Per quanto riguarda *C. coli*, non tutti gli isolati veicolavano i geni *cdtA* e *cdtC* anche se tutti i *C. coli* isolati risultavano positivi alla PCR usando i primer del *cdt* cluster. Questi risultati sono in accordo con Ripabelli *et al.* (2010) che ha segnalato la presenza di diversi errori nelle sequenze dei primer usate per l'identificazione dei geni della CDT e del *C. coli*.

Diversi studi hanno descritto la presenza di geni *cdt* veicolati dai *Campylobacter* isolati da diverse fonti (Bang *et al.*, 2003; Van Deun *et al.*, 2007). Poco, invece, è noto sulla presenza dei geni codificanti la tossina e sulla presenza di *Campylobacter* isolati da uccelli acquatici. Pertanto, i risultati qui presentati suggeriscono che i geni *cdt* possono essere presenti anche in *C. jejuni* e in *C. coli* isolati dall'alzavola.

Degna di nota è l'individuazione del gene *wlaN* in quanto è presumibilmente coinvolto nell'espressione della mimica gangliosidica della sindrome di Guillian-Barrè (Linton *et al.*, 2000). E' interessante notare come la prevalenza (17,5%) di questo gene veicolato da *Campylobacter* spp. isolati nell'alzavola è simile a quella evidenziata in studi condotti su carne di pollame (23.8 %) e su campioni clinici umani (25.0 %) come riferito da Datta *et al.* (2003).

CONCLUSIONI

I risultati della presente indagine sottolineano l'elevata prevalenza di *Campylobacter* spp. nell'alzavola e, poiché questo uccello acquatico vive in zone umide, il *Campylobacter* spp. può essere facilmente trasmesso ad altri uccelli acquatici ed esseri umani tramite l'acqua e/o per contatto diretto. Infatti, Varslot *et al.* (1996) descrisse due epidemie da *C. jejuni* in Norvegia la cui causa venne individuata nella contaminazione di acqua potabile da feci di oche dalle zampe rosse. Inoltre, nella Regione Campania, le alzavole vengono a contatto sia con altri animali che con l'uomo, in particolare durante la stagione venatoria. Possiamo concludere, quindi, che le alzavole, in quanto uccelli migratori, hanno un ruolo epidemiologico importante nella diffusione di *Campylobacter* spp. su ampi territori.

BIBLIOGRAFIA

1. Bang DD, Nielsen EM, Scheutz F, Pedersen K, Handberg K, and M Madsen. (2003). PCR detection of seven virulence and toxin genes of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates from Danish pigs and cattle and cytolethal distending toxin production of the isolates. *J. Appl. Microbiol.* 94: 1003-1014.
2. Colles FM, Dingle KE, Cody AJ, and MC Maiden. (2008). Comparison of *Campylobacter* populations in wild geese with those in starlings and free-range poultry on the same farm. *Appl. Environ. Microbiol.* 74: 3583-3590.
3. Datta S, Niwa H, and K Ito. (2003). Prevalence of 11 pathogenic genes of *Campylobacter jejuni* by PCR in strains isolated from humans, poultry meat and broiler and bovine faeces. *J. Med. Microbiol.* 52: 345-348.
4. Humphrey T, O'brien S, and M Madsen. (2007). *Campylobacters* as zoonotic pathogens: a food production perspective. *Int. J. Food Microbiol.* 117: 237-257.
5. Khan IUH, and TA Edge. (2007). Development of a novel triplex PCR assay for the detection and differentiation of thermophilic species of *Campylobacter* using 16S-23S rDNA internal transcribed spacer (ITS) region. *J. Appl. Microbiol.* 103: 2561-2569.
6. Konkel ME, Gray SA, Kim BJ, Garvis SG, and J Yoon. (1999). Identification of the enteropathogens *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* based on the *cadF* virulence gene and its product. *J. Clin. Microbiol.* 37: 510-517.
7. Lee MD, and DG Newell. (2006). *Campylobacter* in poultry: filling an ecological niche. *Avian Dis.* 50: 1-9.
8. Linton D, Gilbert M, Hitchen PG, Dell A, Morris HR, Wakarchuk WW, Gregson NA, and BW Wren. (2000). Phase variation of a beta-1,3 galactosyltransferase involved in generation of the ganglioside GM1-like lipo-oligosaccharide of *Campylobacter jejuni*. *Mol. Microbiol.* 37: 501-514.
9. Martínez I, Mateo E, Churruca E, Girbau C, Alonso R, and A Fernández-Astorga. (2006). Detection of *cdtA*, *cdtB*, and *cdtC* genes in *Campylobacter jejuni* by multiplex PCR. *Int. J. Med. Microbiol.* 296: 45-48.
10. Nonga HE, and AP Muhairwa. (2010). Prevalence and antibiotic susceptibility of thermophilic *Campylobacter* isolates from free range domestic duck (*Cairina moschata*) in Morogoro municipality, Tanzania. *Trop Anim Health Prod.* 42: 165-172
11. Pickett CL, Pesci EC, Cottle DL, Russell G, Erdem AN, and H Zeytin. (1996). Prevalence of cytolethal distending toxin production in *Campylobacter jejuni* and relatedness of *Campylobacter* sp. *cdtB* gene. *Infect. Immun.* 6: 2070-2078.
12. Ripabelli G, Tamburro M, Minelli F, Leone A, and ML Sammarco. (2010). Prevalence of virulence-associated genes and cytolethal distending toxin production in *Campylobacter* spp. isolated in Italy. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 33: 355-364.
13. Samosornsuk W, Asakura M, Yoshida E, Taguchi T, Nishimura K, Eampokalap B, Phongsisay V, Chaicumpa W, and S Yamasaki. (2007). Evaluation of a cytolethal distending toxin (*cdt*) gene-based species-specific multiplex PCR assay for the identification of *Campylobacter* strains isolated from poultry in Thailand. *Microbiol. Immunol.* 51: 909-917.

14. Talukder KA, Aslam M, Islam Z, Azmi IJ, Dutta DK, Hossain S, Nur-E-Kamal A, Nair GB, Cravioto A, Sack DA, and HP Endtz. (2008). Prevalence of virulence genes and cytolethal distending toxin production in *Campylobacter jejuni* isolates from diarrheal patients in Bangladesh. *J. Clin. Microbiol.* 46: 1485-1488.
15. Thrusfield M. (1995). Surveys. In: Thrusfield M. (Ed.), *Veterinary Epidemiology*, Blackwell Science, Oxford, UK, pp. 178-198.
16. Van Deun K, Haesebrouck F, Heyndrickx M, Favoreel H, Dewulf J, Ceelen L, Dumez L, Messens W, Leleu S, Van Immerseel F, Ducatelle R, and F Pasmans. (2007). Virulence properties of *Campylobacter jejuni* isolates of poultry and human origin. *J. Med. Microbiol.* 56: 1284-1289.
17. Van Dyke MI, Morton VK, McLellan NL, and PM Huck. (2010). The occurrence of *Campylobacter* in river water and waterfowl within a watershed in southern Ontario, Canada. *J. Appl. Microbiol.* 109: 1053-1066.
18. Varslot M, Resell J, and IG Fostad. (1996). Water-borne *Campylobacter* infection probably caused by pink-footed geese. Two outbreaks in Nord-Trøndelag, Stjørdal in 1994 and Verdal in 1995. *Tidsskr. Nor. Laegeforen.* 116: 3366-3369.
19. Zilbauer M, Dorrell N, Wren BW, and M Bajaj-Elliott. (2008). *Campylobacter jejuni*-mediated disease pathogenesis: an update. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 102: 123-129.