

ATTIVITÀ ASSISTITE CON GLI ANIMALI E SALUTE PUBBLICA: MONITORAGGIO SANITARIO CONDOTTO NELL'AREA VERDE DI UN OSPEDALE PSICHIATRICO GIUDIZIARIO IN CAMPANIA

Menna L.F.¹, Santaniello A.^{1*}, Borrelli L.¹, Russo T.P.¹, Fontanella M.¹, Di Maggio A.², Dipineto L.¹, Fioretti A.¹

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

²*CRIUV, Centro di Riferimento Regionale per l'Igiene Urbana Veterinaria, ASL Na1, Napoli, Italy.*

Summary

The animal assisted activities (AAA) are aimed at improving the physical condition or mental patients. The presence of an animal can relieve stress, anxiety, fear, boredom and pain of people who come to find themselves in an uncomfortable situation. However, the contact with animals can be a source of zoonotic infections, especially when the animals are not subjected to regular microbiological controls. Our study therefore aims at monitoring the health of the animals housed in green area of Criminal Mental Hospital against zoonotic pathogens in order to assess the potential risk to operators, doctors and inmates themselves. The isolation of bacteria (*Campylobacter* spp., *Salmonella* spp and *Escherichia coli* O157) were conducted by cultural and molecular methods. Based on surveys conducted for the isolation of *Campylobacter* spp. 9 out of 70 samples were positive for *Campylobacter jejuni* with a prevalence of 12.9% (CI = 6.4 - 23.5%) of the samples analyzed. *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* O157 were consistently negative. Animals investigated in our study could be potential vectors of zoonoses, with special reference to *C. jejuni* infection. Although it is well known from literature data that poultry is the main reservoir of *Campylobacter* spp., during the AAA contact with animals is frequent, so it is very important to focus on the regular health monitoring of animals, in order to protect public and animal health.

INTRODUZIONE

L'utilizzo degli animali a fini terapeutici ha radici molto antiche e nel corso del tempo ha assunto un'importanza crescente. Il moderno termine di Pet Therapy si riferisce alla strutturazione metodologica del coinvolgimento di animali finalizzata al trattamento di specifiche patologie. Tali attività sono caratterizzate da una grande eterogeneità, sia per quanto riguarda il percorso formativo degli operatori, sia per la tipologia degli utenti e le modalità d'azione (Rapporti ISTISAN 07/35). La validità della Pet Therapy è stata sostenuta e riportata in diversi lavori scientifici condotti in contesti diversi, con soggetti depressi (Redefer e Goodman, 1989; Jessen et al, 1996), bambini autistici (Redefer e Goodman, 1989; Meluzzi et al, 2000), pazienti psichiatrici (Corson et al, 1975; McCandless et al, 1985; Beck e Rosemberg, 1986; Bardill e Hutchinson, 1997; Hall e Malpus, 2000), disturbi della comunicazione (Lundgren e Ugalde, 2004) e soggetti con disturbi organici, come le patologie cardiovascolari (Friedmann et al, 1980; Odendaal, 2000).

Da un punto di vista operativo, va scoraggiato l'utilizzo del termine Pet Therapy

perché troppo generico e usato per raggruppare tipologie di attività assai diverse, mentre si preferisce distinguere tra Animal Assisted Activities e Animal Assisted Therapies:

– Animal-Assisted Activities: “Attività svolte con gli Animali” (AAA), che hanno lo scopo di migliorare la qualità della vita di alcune categorie di persone (per esempio ciechi o portatori di handicap psico-fisici). Le AAA vengono effettuate in una vasta gamma di contesti ambientali da professionisti abilitati e para-professionisti e/o volontari di associazioni con specifiche caratteristiche che lavorano con animali.

– Animal-Assisted Therapies: “Terapie assistite con gli Animali” (TAA) o “Uso Terapeutico degli Animali da Compagnia” (UTAC), che affiancano alle terapie tradizionali l’utilizzo di animali con specifiche caratteristiche. Le TAA vengono utilizzate per migliorare lo stato fisico, sociale, emotivo e cognitivo di pazienti. Sono effettuate in ampi e differenti contesti e possono coinvolgere gruppi o singoli individui. Il procedimento viene inoltre documentato e valutato (Rapporti ISTISAN 07/35).

Recentemente, in Italia, la Pet Therapy è stata proposta e utilizzata anche negli Ospedali Psichiatrici Giudiziari (OPG) (AA.VV. 2012). Questi rappresentano una vera e propria comunità di persone che per vari motivi vivono in condizioni di frustrazione, abusi, malattie mentali associate a malattie infettive come l’AIDS, che compromettono il sistema immunitario. Nell’ambito di un OPG, le attività di Pet Therapy di solito si svolgono in una zona verde dove vengono eseguiti anche altri tipi di attività per migliorare le condizioni di vita dei detenuti quali il giardinaggio e la cura degli animali. Se è vero che la presenza di animali domestici in strutture sanitarie è stata associata ad un coinvolgimento emotivo positivo di tutta la comunità, compreso il personale medico e paramedico, il contatto con essi potrebbe essere una fonte di infezioni zoonosiche, soprattutto quando gli animali non sono sottoposti a periodici controlli sanitari e, in particolare, quando le persone coinvolte sono immunodepresse e/o immunocompromesse. Pertanto, il presente studio è stato effettuato con lo scopo di valutare la presenza di *Campylobacter* termotolleranti, *Salmonella* spp. ed *Escherichia coli* O157 nel pollame allevato nell’OPG Aversa, nel Sud Italia considerando soprattutto il potenziale rischio zoonosico per gli operatori, i medici e gli stessi detenuti.

MATERIALI E METODI

Campionamento

La presente indagine è stata effettuata nel periodo febbraio-giugno 2011 nel pollame allevato nell’area verde dell’OPG di Aversa, Sud Italia, dove si trovano un totale di circa 300 animali, costituiti da ovini e caprini, conigli, polli e anatre, tra cui alcune specie selvatiche, come germani reali e Anatre mute. Sono stati sottoposti a campionamento 70 animali di cui 19 germani reali (*Anas platyrhynchos*), 18 anatre mute (*Cairina moschata*), 11 fagiani (*Phasianus colchicus*), 7 oche (*Anser anser*), 15 polli (*Gallus gallus domesticus*). Sono stati effettuati tre tamponi cloacali per ciascun animale, al fine di valutare la presenza di *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. ed *Escherichia coli* O157, rispettivamente, per un totale di 210 campioni. I tamponi cloacali sono stati eseguiti su ogni uccello con tamponi sterili e trasportati in laboratorio al massimo entro 2 ore dal prelievo.

Isolamento e identificazione di Campylobacter spp.

I Campioni sono stati inoculati in *Campylobacter* enrichment broth (Oxoid) e incubati a 42°C per 48 ore in condizioni di microaerofilia (CampyGen, Oxoid). Successivamente, ogni campione è stato seminato su Preston agar (CCDA, Oxoid). Dopo incubazione a 42°C per 48 ore in condizioni microaerofilia, le piastre sono state esaminate per valutare le tipiche colonie di *Campylobacter* termotolleranti. Le colonie sospette sono state seminate nuovamente su agar sangue (Oxoid) e, sempre rispettando le condizioni di microaerofilia, sono state infine incubate a 42°C per altre 24 h. In microscopia a contrasto di fase, le colonie comprendenti microrganismi mobili, ricurvi o a spirale sono stati presuntivamente identificati come *Campylobacter* termotolleranti e sottoposti a PCR. Il DNA è stato estratto da colonie isolate su agar sangue di pecora utilizzando il reagente PrepMan (PE Applied Biosystems, Foster City, USA) seguendo le istruzioni consigliate dal produttore. La presenza specifica del genere *Campylobacter* era basata sull'amplificazione del gene *cadF* usando i primer *cadF2B*, 5'-TTG AAG GTA ATT TAG ATA TG-3' e *cadR1B*, 5'-CTA ATA CCT AAA GTT GAA AC-3' come descritto da Konkel et al. (1999). Tutti gli estratti di DNA venivano esaminati anche per la presenza delle specie *C. jejuni* e *C. coli* rispettivamente mediante i primer C-1, 5'-CAA ATA AAG TTA GAG GTA GAA TGT-3', C-4, 5'-GGA TAA GCA TAG CTA GCT GAT-3' e COL1, 5'-ATG AAA AAA TAT TTA GTT TTT GCA-3', COL2, 5'- ATT TTA TTA TTT GTA GCA GCG-3', come descritto da Winters et al. (1997) e Gonzalez et al. (1997). Le condizioni per la PCR erano calibrate come suggerito da Cloak & Fratamico (2002).

Isolamento e identificazione di Salmonella spp.

Per l'isolamento di *Salmonella* spp. è stata utilizzata la procedura ISO 6579:2002. In particolare, i tamponi cloacali sono stati inoculati in Buffered Peptone Water (BPW, Oxoid Ltd, UK) come pre-arricchimento e incubate a 37° C per 18-24 ore. I campioni positivi sono stati inoculati in Rappaport-Vassiliadis Broth (Oxoid Ltd), come terreno di arricchimento, e incubati a 42° C per 18-24 ore. Le colture venivano seminate su piastre di Xylose-lisina desossicolato Agar (Oxoid Ltd), incubato a 37° C ed esaminate dopo 24 ore. Le colonie sospette sono state poi seminate su un secondo agar selettivo, Brilliant Green Agar (Oxoid Ltd) e incubate a 37° C per 24 ore. Tutti i campioni sospetti sono stati sottoposti a test di identificazione biochimica utilizzando il sistema API20-E (bioMérieux, Francia).

Isolamento e identificazione di Escherichia coli O157

Tutti i campioni sono stati arricchiti in rapporto 1:10 in 10 ml di Tryptone Soy Broth modificato (Oxoid Ltd, Basingstoke, Hampshire, UK) con novobiocina (Oxoid Ltd) e incubati a 41 ± 1 ° C, per 12-18 ore. Ad 1 ml di ciascuna brodocoltura sono stati aggiunti a 20 µl di sfere immunomagnetiche rivestite con anticorpo anti O157 (Dynal Biotech ASA, Oslo, Norvegia) e i preparati sottoposti a separazione immunomagnetica secondo le istruzioni del produttore. Infine, le sfere immunomagnetiche sono state inoculate su entrambi agar sorbitolo MacConkey (Oxoid Ltd) integrato con cefixime-tellurite (Oxoid Ltd) e *E. coli* O157 cromogenic Agar (Biolife Italiana Srl, Milano, Italia). Dopo incubazione a 37° C 18-24 h, sorbitolo-negative colonie sono stati selezionate e sottoposte a screening per la presenza dell'antigene O157 mediante agglutinazione con *E. coli* O157 latex kit (Oxoid Ltd).

RISULTATI

Sulla base delle indagini condotte per l'isolamento di *Campylobacter* termotolleranti, 9 su 70 campioni sono risultati positivi per *C. jejuni* con una prevalenza del 12,9% (intervallo di confidenza = 6,4 al 23,5%) dei campioni cloacali analizzati. In particolare, i campioni positivi sono stati isolati da 4 polli e 5 germani reali. Per quanto riguarda *Salmonella* spp. ed *Escherichia coli* O157 i risultati sono stati sempre negativi. Tutti i risultati sono riportati nella tabella 1.

DISCUSSIONE

Campylobacter termo tolleranti, *Salmonella* spp. ed *Escherichia coli* O157 sono stati i batteri oggetto del presente studio con risultati positivi per *Campylobacter* termotolleranti e negativi per quanto riguarda *Salmonella* spp. ed *E. coli* O157. In particolare, *C. jejuni* è stato isolato in 9 campioni, di cui 4 polli e 5 germani reali. *Campylobacter* termotolleranti, *Salmonella* spp. ed *E. coli* O157 hanno un ampio range di ospiti negli uccelli e nei mammiferi (Caprioli et al., 2005). Questi batteri possono essere trasmessi all'uomo attraverso la contaminazione fecale di cibo, acqua e ambiente, o attraverso il contatto diretto con animali portatori. I *Campylobacter* termotolleranti, principalmente *C. jejuni* e *C. coli*, e *Salmonella* spp. sono i principali batteri responsabili di gastroenterite acuta nell'uomo, in particolare nelle persone con immunodeficienze primarie e anche in soggetti immunocompromessi, sottoposti a trattamenti con chemioterapia o radioterapia, destinatari di trapianto che assumono farmaci immunosoppressori, persone con leucemia, persone con malattie del sistema immunitario e malati di AIDS (Lund e O'Brien, 2011). *Salmonella* spp. è stata oggetto di studio in diverse specie animali, e in particolare nelle specie aviarie (Flament et al, 2012; Hanh TT et al, 2006; Oksenhendler et al, 2011; Pennycott et al, 2012). *Escherichia coli* O157 è un patogeno responsabile di grave tossinfezione alimentare riconosciuto a livello mondiale (Rasmussen e Casey 2001, Sargeant 2002, Simpson, 2002; LeBlanc 2003) associata a diarrea ematica, colite emorragica, sindrome emolitico uremica e porpora trombotica trombocitopenica (Caprioli et al, 1996; Paton e Paton, 1998; Karmali, 2004). I *Campylobacter* termotolleranti sono stati studiati in diverse specie animali, tra cui uccelli, e in particolare nel pollame, che è riconosciuto come uno dei principali serbatoi di infezione (Moran et al, 2009; Colles et al 2011; Lund e O'Brien, 2011; Adzitey et al, 2012; Simpson, 2002). I dati comparativi sulla prevalenza di *Campylobacter* termotolleranti nelle anatre sono piuttosto limitati, anche se questo microrganismo è stato segnalato in Malaysia (Adzitey et al., 2012), Irlanda del Nord (Moran et al., 2009), Canada (Van Dyke et al., 2010), con una prevalenza di 18,35%, 100%, e 57-79,0% rispettivamente. I dati sulla prevalenza di *Campylobacter* termotolleranti nel fagiano sono anche limitati, anche se questo microrganismo è stato segnalato in Germania (Atanassova & Ring, 1999), Russia (Stern et al., 2004), Repubblica Ceca (Nebola et al., 2007), Italia (Soncini et al ., 2006; Dipineto et al, 2008), con una prevalenza del 25,9%, 26,7%, 70,2% e 43,3% rispettivamente.

CONCLUSIONI

Anche se è ben noto dai numerosi dati presenti in letteratura che il pollame è il principale serbatoio di *Campylobacter* termotolleranti ma è anche evidente ed inevitabile che durante le attività di Pet Therapy c'è un contatto con gli animali

trattati, quindi riteniamo che oltre all'utilità degli interventi di Pet therapy come co-terapia è essenziale prestare attenzione anche alla salute pubblica con particolare riferimento alla possibilità che gli animali possono rappresentare una fonte di infezione zoonosica, soprattutto per soggetti immunocompromessi o immunodepressi. È quindi necessario sottoporre gli animali coinvolti nelle attività di Pet Therapy a controlli sanitari periodici e, se necessario, a trattamento farmacologico, il tutto finalizzato alla tutela sanitaria degli animali e dell'uomo. A tal fine sarebbe auspicabile, quindi, stilare dei protocolli sanitari standardizzati che tengano conto delle modalità operative, durante le attività di Pet therapy, in relazione agli organismi patogeni agenti di zoonosi delle specie animali scelte per queste attività.

BIBLIOGRAFIA

- Atanassova V and C Ring. (1999). Prevalence of *Campylobacter* spp. in poultry and poultry meat in Germany. *Intern. J. Food Microbiol.* 51: 187-190.
- Adzitey F, Rusul G, Huda N, Cogan T and J Corry. (2012). Prevalence, antibiotic resistance and RAPD typing of *Campylobacter* species isolated from ducks, their rearing and processing environments in Penang, Malaysia. *Intern. J. Food Microbiol.* 154: 197-205.
- Bardill N and S. Hutchinson. (1997). Animal-assisted therapy with hospitalized adolescents. *J. Child Adolesc. Psychiatr. Nurs.* 10: 17-24.
- Beck S and R Rosenberg. (1986). Frequency, quality, and impact of life events in self-rated depressed, behavioral-problem, and normal children. *J. Consult. Clin. Psychol.* 54: 863-864.
- Caprioli A, Pezzella C, Morelli R, Giammanco A, Arista S, Crotti D, Facchini M, Guglielmetti P, Piersimoni C and I Luzzi. (1996). Enteropathogens associated with childhood diarrhea in Italy. The Italian Study Group on Gastrointestinal Infections. *J. Pediatric Inf. Dis.* 15: 876-873.
- Caprioli A, Conendera G and C. Lucangeli. (2005). *Escherichia coli* O157 e altri *E. coli* Enteroemorraggici. In: Trattato sulle infezioni e tossinfezioni alimentari, Rondinelli E.G, Fabbi M, Marone P. (Eds). Pavia: Selecta Medica.
- Colles FM, Ali JS, Sheppard SK, McCarthy ND and MCJ Maiden. (2011). *Campylobacter* populations in wild and domesticated Mallard ducks (*Anas platyrhynchos*). *Envir. Microbiol. Rep.* 3: 574-580.
- Corson SA, Corson EO, Gwynne PH and LE Arnold. (1975). Pet-facilitated psychotherapy in a hospital setting. *Curr. Psychiatr. Ther.* 15: 277-286.
- Dipineto L, Gargiulo A, De Luca Bossa LM, Rinaldi L, Borrelli L, Menna LF and A Fioretti. (2008). Prevalence of thermotolerant *Campylobacter* in pheasants (*Phasianus colchicus*). *Avian Pathol.* 37: 507-8.
- Flament A, Soubbotina A, Mainil J and D Marlier. (2012). Prevalence of *Salmonella* serotypes in male mule ducks in Belgium. *Vet. Rec.* 24: 311.
- Friedmann CT, Schiebel D and MT McGuire. (1980). Behavioral study of two patient groups during psychotherapy. *Psychol. Rep.* 47: 575-579.
- Hall PL and Z Malpus. (2000). Pets as therapy: effects on social interaction in long-stay psychiatry. *Br. J. Nurs.* 9: 2220-2225.
- Hanh Tran T, Nguyen T Thanh, Hoang Q Thoa, Le T Thi, Lam M Thuan and Nguyen TH Ly. (2006). Prevalence of *Salmonella* spp. in Poultry in Vietnam. *Ann.*

N.Y. Acad. Sci. 1081: 266–268.

Jessen J, Cardiello F and MM Baun. (1996). Avian companionship in alleviation of depression, loneliness, and low morale of older adults in skilled rehabilitation units. *Psychol. Rep.* 78, 339-348.

Karmali M.A., 2004. Infection by Shiga toxinproducing *Escherichia coli*: An overview. *Mol. Biotechnol.* 26: 117–122.

LeBlanc JJ. (2003). Implication of virulence factors in *Escherichia coli* O157:H7 pathogenesis. *Crit. Rev. Microbiol.* 29: 277–296.

Lund BM and SJ O'Brien. (2011). The occurrence and prevention of foodborne disease in vulnerable people. *Foodborne Pathog. Dis.* 8: 961-73.

Lundgren J and V. Ugalde (2004). The demographics and economics of complementary alternative medicine. *Phys. Med. Rehabil. Clin. N. Am.* 15: 955-961.

McCandless P, McCready KF and L Knight. (1985). A model animal therapy program for mental health settings. *Ther. Recreation J.* 19: 55-63.

Meluzzi A, Boratti A, Lorenzetto S, and G Zolesi. (2000). Pet Therapy. Aiutarsi con gli animali. Omega Edizioni, Torino, Italia.

Moran L, Scates P and RH Madden. (2009). Prevalence of *Campylobacter* spp. in Raw Retail Poultry on Sale in Northern Ireland. *J. Food Prot* 9: 1830–1835.

Nebola M, Borilova G and I Steinhäuserova. (2007). Prevalence of *Campylobacter* subtypes in pheasants (*Phasianus colchicus* spp. *torquatus*) in the Czech Republic. *Vet. Med.* 52: 496-501.

Odendaal JS. (2000). Animal-assisted therapy: magic or medicine? *J. Psychosom. Res.* 49: 275-280.

Oksenhendler E, Gerard L, Fieschi C, Malphettes M, Mouillot G, Jaussaud R, Viillard J, Gardembas M, Galicier L, Schleinitz N, Suarez F, Soulas-Sprauel P, Hachulla E, Jaccard A, Gardeur A, Theodorou I, Rabian C and P Debré. (2008). Study Group Infections in 252 Patients with Common Variable Immunodeficiency. *Clin. Inf. Dis.* 46: 1547–54.

Paton AW and JC Paton. (1998). Detection and characterization of Shiga toxinigenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for *stx1*, *stx2*, *eaeA*, enterohemorrhagic *E. coli* *hlyA*, *rfbO111*, and *rfbO157*. *J. Clin. Microbiol.* 36: 598–602.

Pennycott TW, Park A and HA Mather (2006). Isolation of different serovars of *Salmonella enterica* from wild birds in Great Britain between 1995 and 2003. *Vet. Rec.* 158: 817-820.

Rapporti ISTISAN 07/35 (2007). Terapie e attività assistite con gli animali: analisi della situazione italiana e proposta di linee guida. A cura di Francesca Cirulli e Enrico Alleva, ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ, Roma.

Rasmussen MA and TA Casey. (2001). Environmental and food safety aspects of *Escherichia coli* O157:H7 infections in cattle. *Crit. Rev. Microbiol.* 27: 57–73.

Redefer LA and JF Goodman. (1989). Brief report: pet-facilitated therapy with autistic children. *J. Autism. Dev. Disord.* 19: 461-467.

Renter DG and JM Sargeant. (2002). Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: epidemiology and ecology in bovine production environments. *Anim. Health Res.* 3: 83–94.

Simpson VR. (2002). Wild Animals as Reservoirs of Infectious Diseases in the UK.

Vet. J. 163: 128-146.

Soncini G, Valnegri VL, Vercellotti L, Colombo F, Valle D, Franzoni M and C Bersani. (2006). Investigation of *Campylobacter* in reared game birds. *J. Food Prot.* 69: 3021-3024.

Stern NJ, Bannov VA, Svetoch EA, Mitsevich EV, Mitsevich IP, Volozhantsev NV, Gusev VV and VV Perelygin. (2004). Distribution and characterization of *Campylobacter* spp. from Russian poultry. *J. Food Prot.* 67: 239-245.

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.

Tabella 1 - Numero di campioni positivi per numero animali secondo la specie.

Specie animali	<i>Campylobacter</i> spp.		<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella</i> spp.
	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>		
<i>Anas platyrhynchos</i>	5/19	0/19	0/19	0/19
<i>Cairina moschata</i>	0/18	0/18	0/18	0/18
<i>Anser anser</i>	0/7	0/7	0/7	0/7
<i>Phasianus colchicus</i>	0/11	0/11	0/11	0/11
<i>Gallus gallus domesticus</i>	4/15	0/15	0/15	0/15
Totale	9/70	0/70	0/70	0/70