

VALUTAZIONE DI ANTIBIOTICO RESISTENZA E PROFILO GENETICO DI *CAMPYLOBACTER* SPP. TERMOFILII ISOLATI DA POLLI BROILER

Casagrande Proietti P.¹, De Luca S.¹, Comitini F.², Pergola S.², Galli R.³, Marenzoni M.L.¹, Franciosini M.P.¹

¹ Dipartimento di Medicina Veterinaria, Via san Costanzo 4 Perugia 06100,

² Università Politecnica delle Marche Dipartimento di Scienze della Vita e dell'Ambiente via Brezze Bianche Ancona 60131,

³ Fileni SIMAR SRL Località Cerrete Collicelli N° 8 -Cingoli (MC) 62011

Summary

Infection with *Campylobacter jejuni* is considered the most common cause of acute bacterial gastroenteritis in humans worldwide. In general, the occurrence of human *Campylobacter* gastroenteritis has been largely attributed to the consumption of contaminated food animal products, especially poultry, because of the high prevalence of *Campylobacter* in these animals. The aim of this investigation was to determine the antimicrobial susceptibility of thermophilic *Campylobacter* spp. isolated from broiler chickens during productive cycle and at slaughter by the method of broth microdilution plate. Susceptibility towards ampicillin, cephalosporins and imipemem was also evaluated by the disk diffusion methods. The antimicrobial susceptibility pattern of *C. coli* isolates was similar for all strains since they showed fluoroquinolone resistance (ciprofloxacin and nalidixic acid) and susceptibility toward chloramphenicol and aminoglycosides (gentamycin and streptomycin). Only the isolates from a farm were resistant to erythromycin. Differences were also seen in the *C.jejuni* isolates from two different farms since in one they were resistant to streptomycin and in the other one was susceptible to tetracycline. All thermophilic *Campylobacter* spp. were resistant to ampicillin and to cephalosporins. Genotyping by the SAFLP (single-enzyme amplified fragment length polymorphism) revealed homologous fingerprint for the isolates of *Campylobacter coli* e *jejuni* within the same farm while it was dissimilar when compared to genotypic fingerprints coming from the other farms. This could support the hypothesis of clonal expansion of the strains within the same area.

INTRODUZIONE

Campylobacter spp. è considerato, a livello mondiale, tra i principale agenti batterici responsabili di tossinfezioni [14]. Le specie più comunemente associate ad infezione e malattia nell'uomo sono rappresentate da *C. jejuni*, seguito da *C. coli* e *C. lari* [4]. Il consumo di alimenti di origine animale, in particolar modo prodotti avicoli, costituiscono la principale sorgente di infezione umana [1]. Oltre alle potenzialità zoonotiche, l'importanza che tale batterio riveste per la Sanità Pubblica è dovuta alla sua capacità di resistere alla maggior parte di antibiotici impiegati in medicina umana e veterinaria. Numerosi sono infatti gli episodi di resistenza riportati nei confronti di tetracicline, eritromicina, fluorochinoloni, beta-lattamici [16,12,13]. Obiettivo del lavoro è stato quello di valutare, in ceppi di *C. jejuni* e *C.coli*, isolati da polli broiler in allevamento e alla macellazione, il profilo genetico e la suscettibilità nei confronti alcuni antibiotici.

MATERIALI E METODI

Campionamento

Un totale di 110 ceppi di *Campylobacter* spp. sono stati isolati da 85 tamponi cloacali e da 25 campioni cutanei di carcasse di polli broiler. in un periodo compreso tra Luglio e Ottobre 2014. I tamponi cloacali sono stati effettuati in 5 allevamenti commerciali localizzati in Umbria, mentre i campioni di cute sono stati prelevati al macello nelle partite provenienti dagli allevamenti esaminati.

Isolamento e Identificazione

L'isolamento di *Campylobacter* spp. è stato eseguito utilizzando terreni di arricchimento (*Campylobacter* Bolton Enrichment Broth Base con sangue lisato di cavallo e Bolton Broth Selective Supplement) e un terreno selettivo (mCCDA-Modified Charcoal Cefoperazone Deoxycholate Agar). Le piastre sono state incubate a 42°C per 48 ore in condizione di microaerofilia. I ceppi di *Campylobacter* spp. sono stati identificati mediante multiplex PCR [17]. I ceppi utilizzati come controlli positivi sono stati *C. coli* NCTC 11353, *C. fetus* subsp.fetus ATCC 27374, *C. jejuni* ATCC 33291, *C. upsaliensis* NCTC 11541 e *C. lari* NCTC 11552. I ceppi identificati come *C. jejuni* e *C. coli* sono stati tipizzati con la tecnica SAFLP (single-enzyme amplified fragment length polymorphism) come descritto da Champion et al.[2]

Determinazione della suscettibilità agli antimicrobici

La suscettibilità agli antibiotici dei ceppi di *Campylobacter* spp. è stata valutata mediante determinazione della minima concentrazione inibente (MIC) utilizzando il metodo della microdiluzione in brodo su piastra (Eucamp, Thermofisher). Brevemente, un inoculo di 5×10^5 batteri è stato versato in provette contenenti Muller-Hinton broth arricchito con sangue lisato di cavallo (Oxoid) e distribuito in piastre contenenti concentrazioni scalari note dei seguenti antibiotici: gentamicina (0.12–16 µg/mL), streptomina (1–16 µg/mL), ciprofloxacina (0.06–4 µg/mL), tetraciclina (0.25–16 µg/mL), eritromicina (0.5–32 µg/mL), acido nalidixico (2–64 µg/mL) e cloramfenicolo (2–32 µg/mL). Le piastre sono state incubate a 37°C per 48h in condizioni di microaerofilia e successivamente sottoposte a lettura manuale. *C. jejuni* NTCC 11351 è stato utilizzato come controllo positivo. I risultati concernenti cloramfenicolo sono stati valutati in accordo ai criteri interpretativi della Società francese di Microbiologia mentre per gli altri sono stati utilizzati i breakpoints stabiliti dall'EUCAST per *Campylobacter* spp. E' stata determinata inoltre la suscettibilità ad alcuni antibiotici beta-lattamici quali ampicillina (AMP) 10µg, cefalessina (CL) 30µg, cefoxitina(FOX) 30µg, cefotaxime (CTX) 30µg, cefepime (FEP) 30µg e imipemem (IMP) 10µg, mediante il metodo di diffusione su piastra. I risultati concernenti ampicillina e cefotaxime sono stati valutati in accordo ai criteri interpretativi della Società francese di Microbiologia mentre per cefalessina, cefoxitina, cefepime e imipinem sono stati utilizzati i breakpoints stabiliti dall'EUCAST per gli Enterobatteri poiché per *Campylobacter* spp. non sono disponibili breakpoints specifici in riferimento a tali antibiotici.

Analisi statistica

L'analisi statistica è stata condotta utilizzando i test χ^2 , il test F di Fisher e il test Kruskal-Wallis, in base al tipo di variabili analizzate, fissando una $P < 0.05$ come statisticamente significativa.

RISULTATI

La Multiplex PCR ha permesso di identificare 88 ceppi di *C.coli* (80%) di cui 25 isolati dalla cute e 22 ceppi di *C.jejuni*. (20%). In tre dei cinque allevamenti sono stati isolati solo *C. coli*, in uno sia *C. coli* che *C. jejuni* mentre in un allevamento solo ceppi di *C. jejuni*. La tipizzazione genomica eseguita mediante SAFLP-PCR ha consentito di evidenziare, sia per *C. jejuni* che per *C. coli*, genotipi differenti nei diversi allevamenti mentre ceppi di uno stesso allevamento sono risultati appartenere allo stesso genotipo. I profili di antibiotico resistenza valutati mediante metodo di micro - diluizione in brodo sono riportati nelle tabelle 1 e 2. In riferimento al profilo di suscettibilità antibiotica valutata su agar- diffusione in piastra si evince che la maggior parte dei ceppi di *C.coli* e *C.jejuni* è resistente a ampicillina e cefalosporine (1°, 2°, 3° generazione), mentre tutti sono risultati sensibili a cefepime (4° generazione) e imipenem (Tab. 3 e 4) Considerando i ceppi esaminati, 107 (97,2%) sono risultati essere multiresistenti, in quanto si sono mostrati resistenti nei confronti di almeno tre classi di antibiotici (tab.5)

DISCUSSIONE

Il problema dell'antibiotico resistenza derivato da batteri presenti in alimenti di origine animale sta acquistando sempre più importanza nell'ambito della Sanità Pubblica anche nei Paesi in via di sviluppo [10]. Un numero sempre più elevato di ceppi di *Campylobacter* spp. antibiotico-resistenti sono isolati dal pollame; le forme di resistenza di maggiore riscontro sono rappresentate da quelle nei confronti di fluorochinoloni, aminoglicosidi, tetracicline e in minor misura macrolidi [3]. Nella nostra indagine la tipizzazione genomica eseguita mediante SAFLP-PCR ha consentito di evidenziare, sia per *C. jejuni* che per *C. coli*, genotipi differenti nei diversi allevamenti, tuttavia è stato osservato che tutti i ceppi isolati da uno stesso allevamento appartengono allo stesso biotipo. E' da sottolineare che in relazione ai ceppi di *C.coli*, nonostante i genotipi differenti nei diversi allevamenti il profilo dell'antibiotico -resistenza, valutato tramite micro-diluizione in brodo, ha dato risultati sovrapponibili in tutti gli allevamenti, in quanto il 100% degli isolati è risultato resistente a ciprofloxacina, acido nalidixico e tetraciclina e sensibile a gentamicina, streptomina, cloramfenicolo e eritromicina, ad eccezione degli isolati di un unico allevamento che hanno presentato resistenza a questo ultimo antibiotico ($P < 0,001$). Per quanto riguarda invece *C. jejuni*, nei due allevamenti in cui è stato isolato, sono stati identificati due genotipi diversi che hanno mostrato differenti profili di antibiotico resistenza. I ceppi di un allevamento sono, infatti, risultati sensibili a tutti gli antibiotici ad eccezione della streptomina ($P < 0,001$), mentre negli isolati dall'altro è stata osservata resistenza ad acido nalidixico ($P < 0,001$) e ciprofloxacina ($P < 0,001$). Dai nostri risultati è emerso che *C.jejuni* e *C.coli* hanno mostrato percentuali elevate di resistenza ai chinoloni., analogamente a quanto riportato dai dati bibliografici [6,18]. In questo caso un ruolo determinante è stato giocato

dalla pressione esercitata dal largo uso terapeutico, spesso inadeguato di tali farmaci che potrebbe aver favorito la selezione non di uno ma più cloni di *Campylobacter* resistenti [9]. E' emerso, inoltre, dai nostri dati, che differenze tra le 2 specie sono state osservate per quanto concerne la risposta a tetraciclina e streptomina; infatti contrariamente a *C.coli*, *C.jejuni* ha mostrato sensibilità verso la prima ($P<0,001$) e resistenza nei confronti della seconda ($P<0,001$). I dati riferibili alla tetraciclina si discostano da risultati ottenuti in altri lavori [3,7] in cui *Campylobacter* spp. mostra livelli di suscettibilità minori; infatti la percentuale di ceppi di *C.jejuni* sensibili, riscontrati nella nostra indagine, è stata pari al 77,27%. E' da notare, che sebbene l'uso di tetraciclina si sia ridotto in questi ultimi anni, i fenomeni di resistenza nei confronti di questo antimicrobico da parte di germi isolati da prodotti di origine animale [5] sono comuni. Per quanto riguarda la streptomina, i ceppi di *C.jejuni* hanno mostrato percentuali di resistenza pari al 18,1%, con differenze statisticamente significative tra i 2 allevamenti ($P<0,001$). E' comunque da sottolineare che nella nostra area questo gruppo di farmaci viene poco impiegato nell'allevamento del pollo da carne. A dispetto del largo uso dei macrolidi in campo, gli isolati di *Campylobacter* spp. nel nostro studio sono apparsi perlopiù sensibili a eritromicina, conformemente alla maggior parte dei dati riportati in bibliografia [12,18], sebbene alcuni stipiti di *C.coli* provenienti da un allevamento siano risultati resistenti a eritromicina. E' da considerare inoltre che in questo microrganismo l'instaurarsi di resistenza nei confronti dei macrolidi è un meccanismo complesso e non veloce come quello che si verifica nel caso dei fluorochinoloni [12]. Nel nostro lavoro, inoltre, alte percentuali di resistenza sono state osservate per *C.jejuni* e *C.coli* nei confronti di cefalosporine di 1°, 2° e 3° generazione, in accordo con i dati riportati da Giacomelli et al. [7]. Una differenza statisticamente significativa ($P<0,0001$) si è osservata per quanto riguarda la risposta alla ampicillina in quanto le percentuali di sensibilità sono state pari a 31,8% e 2,4 % rispettivamente per *C.jejuni* e *C.coli*. Va comunque specificato che tali batteri in genere sono resistenti naturalmente all'azione dei beta lattamici, in quanto produttori di beta lattamasi [15], sebbene tutti i meccanismi che mediano questa forma di resistenza siano ben lungi dall'essere chiariti [11]. Infine il 97,2% dei ceppi esaminati è risultato essere multiresistente con un pattern maggiormente rappresentato da chinolonici-tetracicline-penicilline-cefalosporine.

CONCLUSIONI

I risultati relativi a antibiotico-resistenza, pur conformi a quanto riportato in bibliografia [3,7], hanno messo in evidenza delle peculiarità di comportamento di *C.jejuni* e *C.coli* nei confronti di alcuni antibiotici. Il fingerprinting genetico ha rivelato l'esistenza di profili genetici uguali nello stesso allevamento, portando ad ipotizzare l'esistenza di fenomeni di espansione clonale degli isolati di *Campylobacter* nell'ambito di una medesima area, come precedentemente riportato da Jonker e Pikard [8]. In conformità a dati precedentemente riportati in letteratura [8], i ceppi di *C.jejuni* e *C.coli* si sono mostrati sensibili solo nei confronti di beta lattamici di 4° generazione e a imipenem.

BIBLIOGRAFIA

1. Acha PN, B Szyfres. (2003). Campylobacteriosis. In : Pan American Health Organization, (III ed). Washington DC: Zoonoses and Communicable Diseases-

- es Common to Man and Animals. Bacterioses and Mycoses. pp 67–72.
2. Champion OL, Best EL and JA Frost . (2002). Comparison of pulsed-field gel electrophoresis and amplified fragment length polymorphism techniques for investigating outbreaks of enteritis due to
 3. Di Giannatale E., Di Serafino G, Zilli k , Alessiani A, Saccini L, Garofalo G, Aprea G and F Marotta. (2014). Characterization of antimicrobial resistance patterns and detection of virulence genes in *Campylobacter* isolates in Italy. *Sensors*. 14(2): 3308–22.
 4. EFSA. (2009). *Campylobacter* in: *The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses and Zoonotic Agents in The European Union in 2007*, pp 109-133.
 5. EFSA(2011). Scientific Opinion on *Campylobacter* in broiler meat production: control options and performance objectives and/or targets at different stages of the food chain .*The EFSA J*.9:2105.
 6. Gaudreau C , G Huguette. (2003) Antimicrobial resistance of *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* strains isolated from humans in 1998 to 2001 in Montréal, Canada. *Antimicrob.Agents Chemother*. 47: 2027–2029.
 7. Giacomelli M, Salata C, Martini M, Montesissa C and A Piccirillo.(2014) Antimicrobial resistance of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from poultry in Italy. *Microb Drug Resist* 20:181-188.
 8. Jonker A, JAPicard. (2010). Antimicrobial susceptibility in thermophilic *Campylobacter* species isolated from pigs and chickens in South Africa. *Tydskr. S.Afr.vet.Ver*.81:228-236.
 9. Humphrey TJ, Jørgensen F, Frost JA,Wadda H, Domingue G, Elviss NC, Griggs DJ and LJV Piddock.(2005). Prevalence and subtypes of ciprofloxacin-resistant *Campylobacter* spp. in commercial poultry flocks before, during, and after treatment with fluoroquinolones. *Antimicrob. Agents Chemother*.49:690–698.
 10. Isenbarger DW, Hoge CW, Srijan A, Pitarangsi C, Vithayasai N, Bodhidatta L, Hickey KW and PD Cam. (2002).Comparative antibiotic resistance of diarrheal pathogens from Vietnam and Thailand, 1996–1999. *Emerg. Infect. Dis*.8: 175–180.
 11. Lachance N, Gaudreau C, Lamothe F and LA Larivitre.(1991). Role of the β -lactamase of *Campylobacter jejuni* in resistance to β -lactam agents. *Antimicrob. Agents Chemother*. 35: 813–818.
 12. Luangtongkum T, Morishita TY, Ison AJ, Huang S, Mcdermott PF, Zhang Q (2006). Effect of conventional and organic production practices on the prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter* spp. in poultry. *Appl. Environ. Microbiol*.72: 3600–3607.
 13. Moore JE, Barton MD, Blair IS, Corcoran D, Dooley JSG, Fanning S, Kempf I, Lastovica AJ, Lowery CJ, Matsuda M, Mcdowell DA, McMahan A, Millar BC, Rao JR, Rooney PJ, Seal BS, Snelling WJ and O Tolba. (2006).The epidemiology of antibiotic resistance in *Campylobacter*. *Microbes Infect*. 8: 1955–1966.
 14. Suzuki H, S Yamamoto.(2009). *Campylobacter* contamination in retail poultry

meats and by-products in the world: A literature survey. *J. Vet. Med. Sci.* 71 :255–261.

15. Tajada P, Gomez-Garces JL, Alos JI, Balas D and R Cogollos. (1996). Antimicrobial susceptibilities of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* to 12 b-lactam agents and combinations with b-lactamase inhibitors. *Antimicrob. Agents Chemother.*40: 1924–1925.
16. Van der Walt ML. (2004). *Campylobacter jejuni* infection. In Coetzer JAW, RC Tustin (Eds) *Infectious diseases of livestock* (II edn) Vol. 3. Oxford University Press, Cape Town, pp1479–1483.
17. Wang G, Clark CG., Taylor TM, Pucknell C, Barton C, Price L, Woodward DL and FG Rodgers. (2002). Colony multiplex PCR assay for identification and differentiation of *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis*, and *C. fetus subsp. fetus*. *J. Clin. Microbiol.* 40: 4744–4747.
18. Wieczorek K, J Osek (2013). Antimicrobial resistance mechanisms among *Campylobacter*. *Biomed Res Int.* 2013:1-12.

TABELLA 1. Profili di antibiotico resistenza di *C. coli* valutati mediante microdiluizione in brodo

		N° ceppi (%)					
	GM	S	CIP	TE	E	NA	C
R	1 (1,14)	0 (0)	88 (100)	88 (100)	* 3(3,4)	88 (100)	0 (0)
S	87 (98,86)	88(100)	0 (0)	0 (0)	* 85(96,6)	0 (0)	88 (100)

GM: gentamicina; S: streptomina; CIP: ciprofloxacina; TE: tetraciclina; E: eritromicina; NA: acido nalidixico; C: cloramfenicolo

* differenza statisticamente significativa tra allevamenti

TABELLA 2. Profili di antibiotico resistenza di *C. jejuni* valutati mediante microdiluizione in brodo

		N° ceppi (%)					
	GM	S	CIP	TE	E	NA	C
R	0 (0)	*4 (18,1)	*18 (81,8)	5 (22,73)	0 (0)	*18 (81,8)	0 (0)
S	22 (100)	*18 (81,9)	*4 (18,2)	17(77,27)	22 (100)	*4 (18,2)	22 (100)

GM: gentamicina; S: streptomina; CIP: ciprofloxacina; TE: tetraciclina; E: eritromicina; NA: acido nalidixico; C: cloramfenicolo

* differenza statisticamente significativa tra allevamenti

TABELLA 3. Profilo di antibiotico resistenza per *C. coli* nei confronti di beta -lattamici valutato tramite agar- diffusione in piastra

	N° ceppi (%)					
	AMP	CL	FOX	CTX	FEP	IPM
Resistenti	86 (97,6)*	88 (100)	88 (100)	85(96,5)*	0(0)	0(0)
Sensibili	2 (2,4)*	0 (0)	0 (0)	3(3,5)*	88(100)	88(100)

AMP: ampicillina; CL: cefalessina; FOX: cefoxitina; CTX: cefotaxime; FEP: cefepime; IPM: imipenem

* differenza statisticamente significativa tra allevamenti

TABELLA 4. Profilo di antibiotico resistenza per *C. jejuni* nei confronti di beta lattamici valutato tramite agar diffusione in piastra

	N° ceppi (%)					
	AMP	CL	FOX	CTX	FEP	IPM
Resistenti	15(68,1)	22(100)	22 (100)	21(95,4)	0 (0)	0 (0)
Sensibili	7 (31,9)	0(0)	0 (0)	1 (4,6)	22(100)	22(100)

AMP: ampicillina; CL: cefalessina; FOX: cefoxitina; CTX: cefotaxime; FEP: cefepime; IPM: imipenem

TABELLA 5. Profili di multiresistenza (%)

CLASSI DI ANTIBIOTICI	N° (%)
CHIN,TET,MAC,PEN,CEF	3 (2,7)
CHIN,TET,PEN,CEF	94 (85,5)
AMIN, ,PEN, CEF	4 (3,63)
CHIN,TET,CEF	6 (5,45)

CHIN: chinoloni; TET:tetraciline; MAC: macrolidi; PEN: penicilline; CEF: cefalosporine