

# IDENTIFICAZIONE DI CEPPI DI *CAMPYLOBACTER* SPP. ISOLATI DA EPISODI DI EPATITE VIBRIONICA AVIARE (AVH) / SPOTTY LIVER DISEASE (SLD) DEL BROILER E DELLA GALLINA OVAIOLA

Piccirillo A.<sup>1</sup>, Zandonà L.<sup>2</sup>, Carraro L.<sup>1</sup>, Apostolakos I.<sup>1</sup>, Bano L.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Biomedicina Comparata ed Alimentazione, Università degli Studi di Padova - Viale dell'Università, 16 - 35020 Legnaro (PD).

<sup>2</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Sezione di Treviso - Vicolo G. Mazzini, 4 - 31020 Villorba (TV).

## Summary

Thermophilic *Campylobacter* spp. are recognized as potential cause of Avian Vibronic Hepatitis (AVH) and Spotty Liver Disease (SLD). In the first case, *C. jejuni* and *C. coli* have been identified as the main pathogens involved in the disease, whereas in the second one a new *Campylobacter* spp., namely *C. hepaticus*, has been isolated. In this paper, the results of a study aimed at identifying *Campylobacter* spp. involved in episodes of a disease resembling AVH/SLD are presented. Seventeen *Campylobacter* strains isolated from broilers and layer hens, affected by hepatic and splenic pathological lesions (*e.g.* focal necrosis, anomalous enlargement, modification of the Glisson's capsule), were identified by MALDI-TOF MS and conventional PCR. Out of 17 isolates, 11 were *C. jejuni* and six *C. coli*. In one sample from a layer hen, both *C. jejuni* and *C. coli* were isolated suggesting thus a co-infection. PCR targeting *C. hepaticus* gave negative results. These findings suggest that *C. jejuni* and *C. coli* may be the etiological agents of AVH/SLD cases occurring in commercial poultry in Italy. However, further studies are necessary to elucidate this hypothesis, namely whole genome sequencing will provide a better understanding of the genetic background, mainly the virulence factors, of these strains.

## INTRODUZIONE

*Campylobacter* termofili, in particolare *C. jejuni* e *C. coli*, sono batteri ben adattati alle specie aviari in cui colonizzano il tratto gastroenterico, frequentemente senza causare malattia (Zhang & Sahin, 2013). Tuttavia, *C. jejuni* è stato associato a casi di Epatite vibronica aviare (AVH) già a partire dagli anni '50 ed anche *C. coli* è stato riportato quale possibile agente causale della malattia (Zhang & Sahin, 2013). Più recentemente, da casi di una malattia molto simile all'AVH, ma denominata *Spotty Liver Disease* (SLD), sono stati isolati ceppi di una nuova specie di *Campylobacter*, cui è stato assegnato il nome *C. hepaticus* (Van *et al.*, 2016). Nonostante gli agenti coinvolti siano differenti, alcuni Autori (Jennings *et al.*, 2011; Van *et al.*, 2017a) ritengono che si tratti della stessa malattia considerato che l'epidemiologia e le manifestazioni cliniche e patologiche sono molto simili. Oltre al Regno Unito (Crashaw & Young, 2003; Crawshaw *et al.*, 2015) e all'Australia (Grimes & Reece, 2011; Van *et al.*, 2017a), sia AVH che SLD sono state segnalate negli Stati Uniti, Canada, Nuova Zelanda, Estonia, Austria e Germania (Van *et al.*, 2017b). Mentre l'AVH viene segnalata sporadicamente (Zhang & Sahin, 2013), l'incidenza della SLD è aumentata considerevolmente negli ultimi

anni in Australia, e ciò è stato ricondotto all'ampia diffusione dell'allevamento *free-range* (Grimes & Reece, 2011; Jennings *et al.*, 2011). Infatti, entrambe le malattie possono colpire galline ovaiole e polli da carne in allevamento intensivo, ma la maggior parte dei focolai si verifica in allevamenti alternativi (*free-range* e rurali). La sintomatologia è aspecifica e consiste in mortalità acuta (fino al 10%) e calo dell'ovodeposizione. Le lesioni patologiche sono molto caratteristiche: epatite multifocale acuta con focolai di necrosi di 1-2 mm di diametro e di colore bianco-grigiastro (Crashaw & Young, 2003; Grimes & Reece, 2011). Nonostante sia stato confermato l'isolamento di *C. jejuni* e *C. coli* e *C. hepaticus* da casi di AVH e SLD rispettivamente, studi di infezione sperimentale hanno dimostrato che solo *C. hepaticus* è in grado di riprodurre la malattia (Crawshaw *et al.*, 2015; Van *et al.*, 2017a), mentre i tentativi fatti con *C. jejuni* e *C. coli* sono falliti (Jennings *et al.*, 2011). Dunque, ad oggi sembra essere confermato solo *C. hepaticus* quale agente eziologico della SLD, mentre rimane incertezza sul ruolo di *C. jejuni* e *C. coli* quali agenti causali dell'AVH.

Considerato dunque che ad oggi non si sa ancora con certezza se le due malattie siano riconducibili alla stessa condizione patologica e quale specie di *Campylobacter* sia coinvolta quale agente causale, l'obiettivo di questo studio è stato quello di approfondire le indagini diagnostiche su alcuni casi di malattia riconducibile ad AVH/SLD che hanno coinvolto polli da carne e galline ovaiole nel Nord Italia.

## **MATERIALI E METODI**

### *Campionamento*

Fra il 2013 e il 2017, presso l'Istituto Zooprofilattico delle Venezie (IZSVE), Sezione di Treviso, sono stati isolati 17 di ceppi di *Campylobacter* spp. da episodi di malattia riconducibile ad AVH/SLD verificatisi in allevamenti commerciali di polli da carne e galline ovaiole (Tabella 1).

### *Isolamento di Campylobacter spp.*

L'isolamento dei ceppi di *Campylobacter* inclusi nello studio è avvenuto in conformità alla procedura riportata nel manuale OIE (2012) e che viene di seguito riassunta. Gli organi parenchimatosi con lesioni riconducibili a AVH/SLD sono stati cauterizzati superficialmente e parte dei tessuti profondi sono stati raccolti utilizzando una pipetta Pasteur in vetro sterile. Il campione è stato quindi introdotto in 9 mL di terreno liquido Preston (Biolife), successivamente incubato a 41,5 °C per 48 ore in condizioni di microaerofilia. Al termine dell'incubazione, 10 µL della brodocoltura d'arricchimento sono stati distribuiti per spatolamento sulla superficie del terreno selettivo agarizzato denominato CCDA (Biolife), successivamente posto per 48 ore in condizioni di microaerofilia a 41,5 °C. Ciascuna colonia morfologicamente riconducibile a *Campylobacter* spp. (grigia, piatta, traslucida, con riflessi metallici e tendenza a diffondere sulla superficie dell'agar) è stata trapiantata in 2 piastre di agar sangue (Oxoid) incubate a 37 ± 1°C. Una delle 2 piastre veniva incubata in condizioni di microaerofilia e l'altra in aerobiosi. Le colture microaerofile obbligate sono state quindi raccolte e sottoposte a colorazione di Gram. Le colonie ossidasi positive, costituite da batteri Gram negativi a forma di spirale o virgola, sono state sottoposte a identificazione tramite MALDI TOF MS e protocolli di biologia molecolare di seguito riportati.

#### *Identificazione di Campylobacter spp. tramite MALDI-TOF MS*

Dieci colonie isolate sono state sospese in 300 µl d'acqua ultrapura (W3500, Sigma-Aldrich) a cui venivano aggiunti 900 µl di etanolo. Dopo centrifugazione della sospensione batterica a 20.000 x g per 2 minuti, il *pellet* batterico è stato raccolto e risospeso in 20-50 µl di una soluzione acquosa di acido formico (70/30; vol/vol), a seconda delle dimensioni del *pellet*. E' stato quindi aggiunto pari volume di acetonitrile (Sigma-Aldrich) e la soluzione è stata centrifugata a 20.000 x g per 2 minuti. Successivamente 1 µl del sopranatante è stato trasferito sul supporto MALDI *target plate*, lasciato asciugare a temperatura ambiente e ricoperto con 1 µl di matrice. La matrice è costituita da una soluzione satura ottenuta dissolvendo 2,5 mg di acido *o*-ciano-4-idrossi-cinnamico (HCCA) (Sigma Aldrich) in una soluzione costituita da 500 µl di acetonitrile, 25 µl di acido trifluoroacetico (Bruker Daltonics) e 475 µl di acqua deionizzata.

Gli spettri venivano quindi acquisiti impiegando lo strumento MALDI *Biotyper Microflex* LT (Bruker Daltonics) ed elaborati attraverso il software MALDI *Biotyper* (versione 3.0). Lo strumento era stato precedentemente settato per ottenere spettri costituiti da componenti proteici di origine batterica con una massa compresa tra 1.960 e 20.137 Da. Per ciascun ceppo batterico analizzato lo spettro veniva ottenuto come risultante di 240 *laser shots* acquisiti in modalità automatica. Gli spettri ottenuti venivano poi comparati con quelli contenuti nel database di referenza del software V.3.1.2.0 (Bruker Daltonics), precedentemente implementato con lo spettro del ceppo di referenza di *C. hepaticus* *National Collection of Type Cultures* (NCTC) 13823.

#### *Identificazione di Campylobacter spp. mediante end-point e multiplex PCR*

Il DNA dei 17 ceppi di *Campylobacter* spp. è stato estratto utilizzando il metodo di lisi termica. Brevemente, una o due colonie venivano raccolte da una coltura fresca e sospese in 100 ml di acqua distillata sterile RNasi/DNasi-free (Sigma-Aldrich) e successivamente inattivate mediante bollitura per 20 minuti. I lisati cellulari venivano conservati a -20 °C fino all'esecuzione delle analisi. L'identificazione biomolecolare dei ceppi di *Campylobacter* a livello di genere e specie è stata eseguita mediante PCR multiplex seguendo la procedura descritta da Yamazaki-Matsune *et al.* (2007), leggermente modificata. I *primer* sono stati selezionati tra quelli suggeriti dagli Autori per identificare simultaneamente il genere *Campylobacter* e le specie *C. jejuni* e *C. coli*. La reazione di amplificazione veniva eseguita utilizzando il *Qiagen Multiplex PCR Kit* (Qiagen), in un volume finale di 25 ml contenente 1 ml di DNA batterico, nel termociclatore 2720 (Applied Biosystems). I ceppi di referenza *C. jejuni* *American Type Culture Collection* (ATCC) 33560 e *C. coli* *Collection de l'Institut Pasteur* (CIP) 70.80 venivano usati come controlli positivi.

Allo stesso tempo, veniva eseguita anche un'*end-point* PCR per l'identificazione di *C. hepaticus* seguendo il protocollo descritto da Van *et al.* (2018), leggermente modificato. La reazione di amplificazione veniva eseguita utilizzando la *Dream Taq Green PCR Master Mix* (ThermoFisher Scientific), in un volume finale di 25 ml contenente 1 ml di DNA batterico, nel termociclatore 2720 (Applied Biosystems, Monza, Italy). Il ceppo di referenza *C. hepaticus* NCTC 13823 veniva usato come controllo positivo.

I prodotti di PCR venivano separati mediante elettroforesi su gel di agarosio 3% in *Buffer* TBE 1X con l'aggiunta di 0.1 µl/ml (v/v) di *SybrSafe™ TM DNA Gel Stain* (Life Technologies). Le bande venivano visualizzate con il *Gel Doc™ XR* (BioRad).

## RISULTATI

Alla *multiplex* PCR, tutti i 17 ceppi sono stati confermati *Campylobacter* spp. di cui 11 *C. jejuni* e 6 *C. coli*. Da notare è la presenza contemporanea di *C. jejuni* e *C. coli* in uno stesso campione isolato da una gallina ovaioia (17/01/4401). Alla *end-point* PCR per l'identificazione di *C. hepaticus* tutti i ceppi testati sono risultati negativi.

La stessa identificazione è stata ottenuta anche attraverso MALDI TOF MS, ad eccezione del campione con coltura mista (17/01/4401) dove era stata individuata un'unica specie di *Campylobacter*.

## DISCUSSIONE

I risultati ottenuti nel presente studio dimostrano il coinvolgimento di *C. jejuni* e/o *C. coli* negli episodi di SLD e AVH verificatisi in allevamenti commerciali del pollo da carne e della gallina ovaioia. Sebbene la malattia non sia stata mai riprodotta sperimentalmente nel pollame impiegando *C. jejuni* e *C. coli*, la localizzazione in organi parenchimosi fa ritenere che questa consegua a una setticemia. Infatti, mentre la localizzazione epatica potrebbe essere ricondotta a una colonizzazione avvenuta attraverso il coledoco, quella splenica può trovare spiegazione solo con l'entrata in circolo del microrganismo.

Nelle realtà produttive in cui la malattia è ricorrente si adotta spesso la vaccinazione con stabulogeno allestito a partire da ceppi di *C. jejuni* e *C. coli* isolati in corso di malattia. Tale approccio profilattico viene regolarmente ripetuto in gruppi di ovaiole e riproduttori allevati in strutture in cui la malattia si è presentata ripetutamente nei cicli precedenti, confermando l'utilità di un'azione profilattica nei confronti di queste due specie microbiche che, ad oggi, non sono state ancora messe in relazione con la malattia in modo inconfutabile.

Il prossimo passo sarà quello di caratterizzare geneticamente gli isolati sequenziando l'intero genoma (WGS). Il sequenziamento dell'intero genoma di questi *C. jejuni* e *C. coli* ci consentirà di studiarli approfonditamente da un punto di vista genetico e di valutare le relazioni genetiche e filogenetiche con ceppi di riferimento di *C. jejuni*, *C. coli*, *C. hepaticus* e altri *Campylobacter*. Inoltre, il WGS consentirebbe di indagare l'eventuale esistenza di fattori genetici di virulenza comuni alle tre specie di *Campylobacter*. Le informazioni scaturite da questo studio ci consentiranno di chiarire il loro potenziale coinvolgimento e ruolo patogeno quali agenti eziologici dell'Epatite vibriónica aviare/*Spotty Liver Disease*.

## BIBLIOGRAFIA

1. Crawshaw T, and Young S. (2003). Increased mortality on a free-range layer site. *Vet. Rec.* 153: 664.
2. Crawshaw TR, Chanter JI, Young SC, Cawthraw S, Whatmore AM, Koylass MS, Vidal AB, Salguero FJ, and Irvine RM. (2015). Isolation of a novel thermophilic *Campylobacter* from cases of spotty liver disease in laying hens

- and experimental reproduction of infection and microscopic pathology. *Vet. Microbiol.* 179: 315-321.
3. Grimes T, and Reece R. (2011). Spotty liver disease-an emerging disease in free-range layers in Australia. 60th Western Poultry Disease Conference.
  4. Jennings JL, Sait LC, Perrett CA, Foster C, Williams LK, Humphrey TJ, Cogan TA. (2011). *Campylobacter jejuni* is associated with, but not sufficient to cause vibronic hepatitis in chickens. *Vet. Microbiol.* 149: 193-199.
  5. Van TT, Elshagmani E, Gor MC, Scott PC, Moore RJ. (2016). *Campylobacter hepaticus* sp. nov., isolated from chickens with spotty liver disease. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 66: 4518-4524.
  6. Van TT, Elshagmani E, Gor MC, Anwar A, Scott PC, Moore RJ. (2017a). Induction of spotty liver disease in layer hens by infection with *Campylobacter hepaticus*. *Vet. Microbiol.* 199: 85-90.
  7. Van TTH, Gor MC, Anwar A, Scott PC, Moore RJ. (2017b). *Campylobacter hepaticus*, the cause of spotty liver disease in chickens, is present throughout the small intestine and caeca of infected birds. *Vet. Microbiol.* 207: 226-230.
  8. Van TTH, Anwar A, Scott PC, Moore RJ. (2018). Rapid and specific methods to differentiate foodborne pathogens, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, and the new species causing spotty liver disease in chickens, *Campylobacter hepaticus*. *Foodborne Pathog. Dis.* 22.
  9. Yamazaki-Matsune W, Taguchi M, Seto K, Kawahara R, Kawatsu K, Kumeda Y, Kitazato M, Nukina M, Misawa N, Tsukamoto T. (2007). Development of a multiplex PCR assay for identification of *Campylobacter coli*, *Campylobacter fetus*, *Campylobacter hyointestinalis* subsp. *hyointestinalis*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter lari* and *Campylobacter upsaliensis*. *J. Med. Microbiol.* 56: 1467-1473.
  10. Zhang Q, and O Sahin. (2013). Campylobacteriosis. In: Swayne DE, Glisson JR, McDougald LR, Suarez DL, Nair V (Eds.), *Diseases of Poultry*, Wiley-Blackwell, Ames, Iowa, pp. 737-750.
  11. OIE (2012). Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals - *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* - chapter 2.9.3

**Tabella 1.** Ceppi di *Campylobacter* spp. isolati da episodi di malattia in polli da carne e galline ovaiole, fra il 2013 e il 2017.

Riferimento ceppo	<i>Campylobacter</i> spp.	Specie	Organo	Lesioni A/P
13/02/2766	<i>C. jejuni</i>	Pollo da carne	Fegato	Epatite necrotica e focolai disseminati dalle dimensioni di 0,5-1mm
14/06/7281	<i>C. jejuni</i>	Gallina ovaiole	Fegato	Periepatite con ispessimento e aspetto traslucido della glissoniana. Splenomegalia
14/02/7704	<i>C. jejuni</i>	Pollo da carne	Fegato	Epato-splenomegalia
14/03/8141	<i>C. jejuni</i>	Pollo da carne	Fegato	Necrosi epatiche miliare disseminate
9263/14	<i>C. jejuni</i>	Cappone	Fegato	Epatomegalia e splenomegalia caratterizzate da multifocali formazioni nodulari di aspetto biancastro che si approfondano nel parenchima
16/03/2264	<i>C. jejuni</i>	Pollo da carne	Fegato	Epatite con foci necrotici multipli disseminati su tutto il parenchima
8728/16	<i>C. jejuni</i>	Gallina ovaiole	Fegato	Periepatite con aspetto traslucido della glissoniana che si presenta parzialmente distaccata
17/02/2351	<i>C. jejuni</i>	Gallina ovaiole	Fegato	Steatosi epatica con inspessimento e opacizzazione della glissoniana
4572/17	<i>C. jejuni</i>	Pollo da carne	Fegato	Lieve epatomegalia. Flebili necrosi epatiche sulla superficie dell'organo
17/03/5476	<i>C. jejuni</i>	Gallina ovaiole	Fegato	Flebili necrosi epatiche disseminate. Splenomegalia
17/01/4401	<i>C. coli - C. jejuni</i>	Gallina ovaiole	Fegato	Epato-splenomegalia. Glissoniana ispessita e traslucida
14/01/4211	<i>C. coli</i>	Gallina ovaiole	Fegato	Rottura epatica. Fegato pallido e friabile
14/01/7281	<i>C. coli</i>	Gallina ovaiole	Fegato	Periepatite con ispessimento e aspetto traslucido della glissoniana. Splenomegalia
14/02/7921	<i>C. coli</i>	Pollo da carne	Milza	Epato-splenomegalia
11444/5/14	<i>C. coli</i>	Gallina ovaiole	Fegato	Inspessimento e aspetto traslucido della glissoniana; pericardite fibrinosa
8760/15	<i>C. coli</i>	Gallina ovaiole	Fegato	Epato-splenomegalia