

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

FACOLTÀ DI MEDICINA VETERINARIA

Corso di laurea in Medicina Veterinaria

Dipartimento di Sanità Pubblica, Patologia Comparata e Igiene Veterinaria



TESI DI LAUREA

PROFILI DI ANTIBIOTICO RESISTENZA E RICERCA DI INTEGRONI DI CLASSE 1 E 2 IN *CAMPYLOBACTER JEJUNI* E *CAMPYLOBACTER COLI* DI TACCHINI DA CARNE

Relatore: dr.ssa Alessandra PICCIRILLO

Correlatore: dr.ssa Martina GIACOMELLI

Laureando: Giacomo Berto

Matricola: 542050/MV

Anno Accademico 2010-2011

Indice

1. Introduzione	pag. 1
1.1. Infezione da <i>Campylobacter</i> nell'uomo	pag. 2
1.2 Infezione da <i>Campylobacter</i> negli animali	pag. 3
1.3 Prevalenza di <i>Campylobacter</i> in Europa	pag. 6
1.4 Prevalenza di <i>Campylobacter</i> nel tacchino	pag. 8
1.5. Antibiotico-resistenza di <i>Campylobacter</i>	pag. 9
2. Scopo del lavoro	pag. 18
3. Materiali e metodi	pag. 20
3.1 Raccolta dei campioni	pag. 20
3.2 Antibiogrammi e antibiotici utilizzati	pag. 21
3.3 Estrazione del DNA	pag. 22
3.4. <i>Real-time</i> PCR per la ricerca di integroni di classe 1 e 2	pag. 23
3.5 Analisi dei dati	pag. 24
4. Risultati	pag. 25
4.1 Antibiogrammi	pag. 25
4.2 Integroni di classe 1 e 2	pag. 34
5. Discussione	pag. 35
6. Conclusioni	pag. 46
7. Bibliografia	pag. 48
Ringraziamenti	pag. 65

1. INTRODUZIONE

I batteri del genere *Campylobacter* sono considerati la più comune causa di zoonosi in Europa e nel mondo, nonostante la loro incidenza sia scarsamente nota all'opinione pubblica a differenza di altri batteri patogeni, come *Salmonella* ed *Escherichia coli* vero-citotossico. Negli Stati Uniti, su 5,2 milioni di casi clinici annui di patologie alimentari, si stima che ben 2,4 milioni siano dovuti a *Campylobacter* (CDC, 2005).

I batteri appartenenti alla famiglia *Campylobacteriaceae* possono essere convenzionalmente separati in tre gruppi sulla base delle caratteristiche fenotipiche. Il primo e più importante gruppo, per quanto concerne la Sanità Pubblica, consiste in cinque specie termofile enteropatogene. In questo gruppo sono collocati *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis* e *C. helveticus*, anche se quest'ultima specie viene da molti considerata termo-tollerante, e quindi non inclusa in questa categoria. Il secondo gruppo include quattro specie ben conosciute in ambito veterinario a causa della loro frequente presenza come patogeni o commensali in animali di allevamento, nonostante alcune specie siano capaci di provocare malattia nell'uomo. A questo gruppo appartengono *C. hyointestinalis*, *C. sputorum*, *C. fetus* e *C. mucosalis*. Nel terzo gruppo infine sono raggruppate specie di primario interesse della medicina umana (*C. concisus*, *C. curvus*, etc.). (Taylor e Keelan, 2006)

Campylobacter sono bacilli curvi, a spirale, che appaiono a forma di S e hanno dimensioni che variano da 0,2 µm a 0,5 µm di diametro e da 0,5 µm a 8,0 µm di lunghezza (Penner, 1988). Tutte le specie sono mobili e possiedono un solo flagello a un polo, anche se, talvolta, sono stati osservati flagelli a entrambi i poli cellulari (Murray *et al.*, 2008).

Le specie termofile enteropatogene vengono isolate dal tratto intestinale degli uomini e/o degli animali e presentano una crescita ottimale a temperature intorno ai 42 °C, sebbene siano sufficienti 37 °C per una crescita minima.

Campylobacter sono microaerofili e per una crescita soddisfacente richiedono un'atmosfera comprendente il 5% di ossigeno, il 10% di anidride carbonica e l'85% di azoto (Murray *et al.*, 2008).

1.1 Infezione da *Campylobacter* nell'uomo

Campylobacter jejuni è ritenuto la più importante causa di enterite nell'uomo essendo isolato nel 36,4% di casi clinici di patologie gastro-enteriche. *Campylobacter coli* può essere considerato la seconda principale causa di campilobatteriosi, seguito da *Campylobacter lari*, ma con percentuali nettamente inferiori a *C. jejuni*, rispettivamente dello 0,19% e dello 0,01% (EFSA, 2011). Dati EFSA (2011) riportano per l'anno 2009 un aumento del 4% rispetto all'anno precedente delle patologie enteriche provocate da questi batteri, con una stima di 198.252 casi clinici accertati nei soli Stati membri dell'Unione Europea, corrispondenti a 45,9 casi su 100.000 abitanti.

Nell'uomo, la campilobatteriosi si manifesta principalmente come una patologia enterica caratterizzata da diarrea infiammatoria acquosa e, talvolta, emorragica, con dolori addominali e febbre ondulante. I sintomi gastro-enterici vengono anche definiti "diarrea del viaggiatore", inizialmente attribuita a infezioni da *E. coli*, ma successivamente attribuita a *Campylobacter*. A questo quadro clinico più comune possono in alcuni casi svilupparsi delle complicazioni, cui seguono danni a lungo termine per il paziente. Queste includono la sindrome di Guillain-Barrè, una malattia autoimmune del sistema nervoso periferico, caratterizzata da una demielinizzazione delle strutture nervose e conseguente paralisi flaccida, con un'incidenza di 1 caso per 1.000 casi di infezione da *Campylobacter* (Nachamkin *et al.*, 1998). Altre possibili complicazioni di questa infezione possono essere lo sviluppo di un'artrite immuno-mediata (Helms *et al.*, 2006) e di un'artrite reattiva (Dooruyin *et al.*, 2008), condizioni caratterizzate da gonfiori dolorosi alle articolazioni che

possono durare da settimane ad anni. Recenti studi suggeriscono inoltre che l'infezione da *C. jejuni* possa essere uno dei fattori implicati nello sviluppo di una patologia intestinale chiamata morbo di Crohn (Lamhonwah *et al.*, 2005).

I fattori di rischio per contrarre il patogeno sono rappresentati dal consumo e dalla manipolazione di carni avicole crude o poco cotte (Friedman *et al.*, 2000; Studha e Andersson, 2000), prodotti avicoli, latte non pastorizzato (Doyle *et al.*, 1982; EFSA, 2006; Arun, 2008), cibi crudi che hanno subito una possibile cross-contaminazione con carni avicole contaminate dal batterio. A queste cause prettamente di origine alimentare si aggiunge il possibile consumo di acqua contaminata dal microrganismo, pervenuto tramite scarichi derivanti da impianti di macellazione di avicoli (Blaser *et al.*, 1984; Rosef *et al.*, 2001) o da deiezioni di uccelli selvatici. La vera incidenza delle manifestazioni enteriche, e quindi dell'entità della campilobatteriosi dell'uomo, risulta di difficile stima a causa di una serie di ragioni. La prima ragione è caratterizzata dal fatto che la patologia enterica è autolimitante e spesso la persona malata non la riporta; la diarrea inoltre viene trattata sintomaticamente e non vengono eseguiti test diagnostici. Un altro motivo a favore di tale considerazione risiede nel fatto che le strutture sanitarie in cui la persona malata viene ricoverata in caso di complicazioni, non ci sono test diagnostici utilizzati di *routine* per una diagnosi eziologica. Infine, quando la malattia è causata da alimenti contaminati spesso l'alimento stesso non è disponibile per analisi microbiologiche (Franco e Williams, 2001).

1.2 Infezione da *Campylobacter* negli animali

Le specie termofile di *Campylobacter* sono comunemente rinvenute come commensali del tratto gastrointestinale di specie selvatiche, quali anatre e gabbiani; di specie di allevamento, quali bovini, piccoli ruminanti e suini; di specie da compagnia, quali cani e gatti; e in tutte le specie avicole da consumo

(Danborg *et al.*, 2004; Bae *et al.*, 2005; Thakur e Gebreyes, 2005; Acik *et al.*, 2006; EFSA, 2011). Negli avicoli e specialmente nel broiler, la colonizzazione avviene in maniera imponente a livello ciecale ed essa è localizzata a livello della mucosa intestinale, al di sopra delle cripte dei villi (Beery *et al.*, 1988, Byrne *et al.*, 2007). Tale evidenza è supportata anche dal fatto che, nelle procedure di laboratorio, il batterio è maggiormente isolato da campioni ciecali piuttosto che da tamponi cloacali con conseguente variazione dei risultati di prevalenza in base al campione utilizzato (Bardon *et al.*, 2008)

Nel broiler studi recenti hanno inoltre dimostrato l'assenza di segni clinici o patologici in animali risultati positivi all'isolamento del batterio, confermando in questo animale il ruolo di commensale di tale microrganismo (Dhillon *et al.*, 2006). Infatti, l'alta temperatura metabolica del pollo e in generale degli avicoli di allevamento, predispone queste specie ad essere ospiti ottimali per *Campylobacter* termofili (Horrocks *et al.*, 2009). Oltre al consumo di alimenti contaminati dal batterio, un'ulteriore possibile fonte di contagio da parte dell'uomo è rappresentata da animali che fungono da *reservoir* (Blaser *et al.*, 1984).

Questo lavoro è incentrato sullo studio del tacchino come fonte di *Campylobacter* e si pone l'obiettivo di aumentare le conoscenze relative all'antibiotico-resistenza del batterio isolato da tale specie. La bibliografia in merito è assai scarsa, essendo l'attenzione dei ricercatori incentrata prevalentemente su altre specie di più esteso consumo e di maggiore interesse commerciale, come il broiler. Anche nel tacchino, come nel broiler, *Campylobacter* è frequentemente presente come commensale del tratto gastroenterico e nella maggior parte dei casi non provoca manifestazioni cliniche. Il punto di entrata in allevamento del batterio è ancora molto discusso, ma le principali fonti di infezione sono: l'ambiente di allevamento, i mangimi, i tecnici di allevamento che fungono da veicolo per l'agente patogeno, gli uccelli selvatici, gli animali domestici presenti in allevamento (quali cani) e anche gli insetti, come le mosche (Shane *et al.*, 1985; Newell *et al.*, 2003; Newell e

Fernely, 2003; Bates *et al.*, 2004; Hald *et al.*, 2004). A conferma di quest'ultimo mezzo di trasmissione, alcuni studi hanno dimostrato che la prevalenza stagionale dell'insetto può essere associata a un aumentato rischio di contrarre l'infezione da parte del broiler. Inoltre, il controllo ambientale delle mosche, tramite l'utilizzo di reti anti-insetto nel sistema di ventilazione dell'allevamento, ha evidenziato un ritardo ed una diminuzione della colonizzazione degli avicoli da parte di *Campylobacter* (Hald *et al.*, 2007).

Quando un soggetto diviene positivo all'infezione, l'alta carica batterica eliminata con le feci e la coprofagia da parte dei soggetti sani diviene un mezzo per una rapida diffusione del batterio nell'allevamento. La trasmissione è quindi di tipo orizzontale, tra soggetto infetto e soggetto sano. Il ruolo della trasmissione verticale è ancora controverso, poiché il batterio è stato rinvenuto a bassi livelli nel seme (Buhr *et al.*, 2005) e nei follicoli ovarici (Cox *et al.*, 2005). Non ci sono tuttavia evidenze dirette che *Campylobacter* derivato dai riproduttori sia una rilevante e significativa fonte di infezione per la progenie.

Nonostante infezioni sperimentali nel broiler, abbiamo dimostrato che l'animale può contrarre l'infezione da *Campylobacter* già al primo giorno di vita, in allevamenti commerciali la presenza del microrganismo nei campioni fecali viene rilevata non prima delle due o tre settimane di vita dell'animale (Stern *et al.*, 2001). La ragione di questa cosiddetta fase di latenza è tuttora sconosciuta, ma potrebbe essere dovuta all'effetto protettivo degli anticorpi di origine materna (Sahin *et al.*, 2003) oppure a differenze nella flora microbica dell'ospite dovute all'età dell'animale stesso. In quest'ultima ipotesi, la flora microbica residente nell'apparato gastro-enterico del pollo svolgerebbe un ruolo competitivo nei confronti di *Campylobacter*, ritardandone la colonizzazione (Van der Wielen *et al.*, 2000). La comprensione delle ragioni di questa fase di latenza potrebbe essere la chiave per lo sviluppo di nuove misure di controllo della prevalenza del batterio in allevamento.

Durante la macellazione, i principali punti critici per la contaminazione delle carcasse sono stati identificati nella spiumatura, nell'eviscerazione e nel

lavaggio finale delle stesse, con variazioni altalenanti sulla prevalenza del batterio riscontrata a seconda dell'operazione effettuata in catena di macellazione. La scottatura delle carcasse, con acqua a temperature anche superiori ai 60°C, provoca una diminuzione della carica batterica sulla carcassa stessa, che tuttavia aumenta durante le operazioni di spiumatura causando una cross-contaminazione (Guerin *et al.*, 2010; Hayama *et al.*, 2011). La carica batterica poi aumenta ulteriormente durante le operazioni di eviscerazione a causa di fuoriuscite di contenuto intestinale ricco di *Campylobacter* negli animali positivi (Rosequist *et al.*, 2006; Guerin *et al.*, 2010). Dopo l'eviscerazione, il lavaggio della carcassa può risultare utile per diminuire la carica batterica, ma potrebbe anche causare un intrappolamento del patogeno a livello della cavità addominale o dei follicoli delle penne (Wempe *et al.*, 1983; Guerin *et al.*, 2010). La contaminazione degli ambienti di macellazione, quindi, non può essere evitata quando vengono processati animali positivi a *Campylobacter* (Herman *et al.*, 2003). Tuttavia, in un altro studio sono stati identificati batteri veicolati da particelle aeree e micro-gocce durante i vari processi di lavorazione, anche per partite di animali risultate negative alla presenza del microrganismo (Allen *et al.*, 2007). Il batterio può inoltre resistere alle procedure di pulizia e disinfezione degli ambienti di macellazione rimanendo vitale e contaminando successive partite e carcasse, oppure permanere sulla superficie della carcassa stessa, facilitato dalla formazione di un biofilm superficiale, costituendo un'ulteriore fonte di contaminazione per ciò con cui viene in contatto (Peyra *et al.*, 2008; Perko-Makela *et al.*, 2009).

1.3 Prevalenza di *Campylobacter* in Europa

In Europa l' *European Food Safety Authority* (EFSA), attraverso una continua attività di sorveglianza, produce annualmente dei *report* sulla prevalenza di *Campylobacter* negli animali destinati alle produzioni alimentari e sui fattori di

rischio che contribuiscono alla comparsa dell'infezione negli animali e negli alimenti.

Il *report* EFSA del 2011 ha riportato per l'anno 2009 una prevalenza media di *Campylobacter* pari al 71,2% in gruppi di broiler provenienti da Stati membri dell'Unione Europea e da Stati non appartenenti all'Unione, con un *range* variabile tra il 7% in Estonia, Finlandia e Norvegia e il 100% in Romania. Su un totale di 5.457 ceppi batterici isolati, il 60,8% era rappresentato da *C. jejuni*, il 41,5% da *C. coli* e lo 0,2% da *C. lari*.

Per il suino le percentuali di prevalenza sono risultate variabili tra il 3,2% e il 67,6%, mentre per i bovini i dati di prevalenza sono risultati variabili tra valori inferiori all'8% in Italia fino al 58% in Danimarca. Nel 2009, infine, sono stati testati 1.582 campioni di feci provenienti da cani e da gatti, rilevando prevalenze di *Campylobacter* variabili tra lo 0% in Italia e il 27% in Norvegia.

Nel *report* sono stati forniti anche i dati relativi a campionamenti eseguiti per rilevare la presenza del batterio negli alimenti. Tali campionamenti sono stati effettuati principalmente su carni avicole, le quali vengono considerate un'importante fonte di infezione per l'uomo. I valori di prevalenza di *Campylobacter* nella carne di pollo sono risultati molto variabili, dallo 0% al 95% di positività, a seconda dello Stato membro da cui provenivano i campioni. Di particolare rilievo è risultata la presenza di 6 Stati membri in cui si sono registrate prevalenze del batterio da molto alte (superiori al 50%) a estremamente alte (superiori al 75%) in campioni di carne di pollo prelevati da macelli. In questi stessi Stati, sono state rilevate alte prevalenze del microrganismo anche in campionamenti effettuati nella grande e piccola distribuzione. In Spagna, per esempio, sempre nella carne di pollo è stata rilevata una prevalenza del batterio del 95% al macello e del 49,5% alla vendita al dettaglio.

Quest'ultima evidenza risulta di particolare interesse perché dimostra come *Campylobacter* possa facilmente raggiungere il consumatore attraverso tutta la catena produttiva.

I dati, che l'EFSA sta raccogliendo, suggeriscono dunque una particolare diffusione di questo batterio, presente non solo a livello del comparto produttivo alimentare, ma anche negli animali da compagnia, sottolineando l'ampia adattabilità del microrganismo a numerosi ambienti diversi.

1.4 Prevalenza di *Campylobacter* nel tacchino

Analizzando i dati di prevalenza di *Campylobacter* spp. nel tacchino, in allevamento o durante la macellazione, è immediato accorgersi dell'ampia variabilità a seconda dei vari studi considerati: 33,7% in Gran Bretagna (Little *et al.*, 2008), 46% in Ontario, Canada meridionale (Cook *et al.*, 2008), 1,6% Maryland, Stati Uniti (Zhao *et al.*, 2010), 83%-87% Ohio, Stati Uniti (Luangtongkum *et al.*, 2007), 91,7% Hannover, Germania (Atanassova *et al.*, 2007), 65-95% Stati Uniti (Cox *et al.*, 2000, Weasley *et al.*, 2005). La maggior parte di *Campylobacter* isolati dal tacchino appartiene alla specie *C. jejuni*, seguita da *C. coli* e raramente da altre specie di scarso interesse epidemiologico (Acuff *et al.*, 1986; Van Looveren *et al.*, 2000; Bork *et al.*, 2002; Logue *et al.*, 2003; Atanassova *et al.*, 2007; Perko-Makela *et al.*, 2009). Alcuni studi tuttavia hanno riportato dati contrastanti a quanto detto pocanzi, riscontrando una netta prevalenza di *C. coli* rispetto alla specie *C. jejuni* (Pezzotti *et al.*, 2002; Smith *et al.*, 2004; Choon Lee *et al.*, 2005). La selezione di una o dell'altra specie può essere suggerita dal diverso regime di trattamento antimicrobico attuato durante l'allevamento, in grado di indirizzare la specie dotata di maggiore resistenza verso la colonizzazione dell'ospite (Logue *et al.*, 2010). Avendo quindi le due specie caratteristiche diverse, per quanto concerne l'antibiotico-resistenza e i fattori di rischio diversi per lo sviluppo di malattia nell'uomo, è evidente la necessità della precisa identificazione della specie batterica stessa (Gillespie *et al.*, 2002).

Di particolare interesse risultano alcuni studi che hanno rilevato una variazione stagionale nell'incidenza dell'infezione da *Campylobacter* nel tacchino. Doyle (1984) e Logue *et al.* (2003) hanno evidenziato una netta incidenza dell'infezione durante l'inverno e durante la primavera rispetto ai mesi estivi; mentre Blaser *et al.* (1983) e Willis e Murray (1997) hanno rilevato dati in netto contrasto, con incidenze maggiori durante il periodo estivo (prevalenza del 7-33% nei mesi invernali vs 87-97% nei mesi estivi). Tali differenze nella diversa prevalenza del microrganismo, legata alle variazioni stagionali, possono essere associate alla diversa localizzazione geografica in cui sono stati raccolti i campioni (Logue *et al.*, 2003).

1.5 Antibiotico-resistenza di *Campylobacter*

Ci soffermeremo ora brevemente sulla sensibilità agli antimicrobici delle due principali specie di *Campylobacter* (*C. jejuni* e *C. coli*) causa di malattia alimentare nell'uomo, illustrando non solo l'evoluzione dei ceppi resistenti isolati da allevamenti e catene di macellazione, ma anche i possibili meccanismi batterici implicati in tale resistenza.

La campilobatteriosi umana è comunemente una malattia autolimitante, ma spesso viene consigliata la somministrazione di farmaci antimicrobici al fine di diminuire la durata temporale delle manifestazioni cliniche e prevenire le possibili complicazioni. Gli antimicrobici di prima scelta maggiormente utilizzati sono i fluorochinoloni (acido nalidixico, ciprofloxacina) e i macrolidi (eritromicina) (Cocker *et al.*, 2002; Skirrow *et al.*, 2000).

Il problema dell'antibiotico-resistenza, sia in medicina sia in agricoltura, viene considerato dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (WHO), come uno dei maggiori problemi emergenti di Sanità Pubblica poiché si prospetta la realtà di un possibile fallimento terapeutico nella gestione di infezioni apparentemente non letali. I farmaci antimicrobici, infatti, risulterebbero inefficaci nei confronti

dei batteri resistenti, mettendo a rischio la vita del paziente in caso di possibili complicazioni cliniche.

Nel settore della medicina veterinaria, l'utilizzo di mangimi medicati, l'adozione di misure chemioterapiche profilattiche di massa e l'utilizzo di farmaci antimicrobici come promotori di crescita con dosi a livello sub-terapeutico hanno portato ad una progressiva selezione di microrganismi antibiotico-resistenti (EFSA, 2009).

Per quanto concerne la resistenza ai fluorochinoloni, in *Campylobacter* isolati da broiler, questa è stata riscontrata negli Stati Uniti e nel Canada con percentuali variabili tra il 19 e il 50% (Nachamkin *et al.*, 2002; Cook *et al.*, 2009; Zhao *et al.*, 2010). In Europa tali percentuali sono anche maggiori, variabili tra il 17% e il 99% con prevalenze molto elevate, soprattutto in Spagna (Saenz *et al.*, 2000; Pezzotti *et al.*, 2003; Alfredson *et al.*, 2007; D'lima *et al.*, 2007). Dati EFSA (2011) hanno riportato per l'anno 2009 una resistenza media alla ciprofloxacina e all'acido nalidixico del 44% in *C. jejuni* e del 67% in *C. coli*. L'uso dei fluorochinoloni come chemioterapici per la profilassi in allevamento è quindi direttamente implicato nello sviluppo della resistenza a questa classe di farmaci antimicrobici da parte di *Campylobacter*. Negli Stati Uniti, infatti, dal 1995-1996, anni in cui sono stati introdotti in allevamento i fluorochinoloni a scopo metafilattico, le percentuali di *Campylobacter* resistenti a tali chemioterapici sono nettamente aumentate (Gupta *et al.*, 2004). In Australia invece, dove i fluorochinoloni non sono registrati per l'utilizzo non solo nell'allevamento avicolo, ma in tutti gli animali produttori di alimenti per l'uomo, non stupisce che nella regione del Queensland sud-orientale si sia registrato un 100% di sensibilità alla ciprofloxacina, da parte dei *Campylobacter* isolati da avicoli (Miflin *et al.*, 2007). In uno studio francese si è invece messa in luce la diversa sensibilità agli antimicrobici di *Campylobacter* isolati da avicoli di allevamento convenzionale (nei quali i fluorochinoloni venivano usati comunemente come promotori di crescita) e di allevamento *free-range* (in cui tali chemioterapici non venivano utilizzati). La resistenza di *Campylobacter*

isolati nel primo allevamento è risultata maggiore rispetto a quella rilevata nel secondo allevamento in cui si è mantenuta a livelli bassi (Desmonts *et al.*, 2004).

Come conseguenza della situazione generale nel 2004 la *Food and Drug Administration* (FDA) ha bandito negli Stati Uniti l'uso dell'enrofloxacin come chemioterapico nelle misure profilattiche in allevamento e come promotore di crescita (Davidson *et al.*, 2004). Nell'Unione Europea, la licenza veterinaria per l'utilizzo dell'enrofloxacin negli allevamenti avicoli risale al 1991, ma già nel 1999 la stessa raccomandava una limitazione nell'uso dei fluorochinoloni in questi animali (Gallay *et al.*, 2007).

Nei batteri Gram negativi, la DNA girasi è il *target* primario dei fluorochinoloni. Questo enzima è una molecola simile alla topoisomerasi II, implicato nella facilitazione dello svolgimento del DNA, necessario per l'attuazione di varie reazioni, come l'apertura della doppia elica ad opera dell'elicasi, all'inizio della replicazione del DNA stesso e della trascrizione. In *Campylobacter* la resistenza a tali antibiotici è mediata da una mutazione puntiforme del gene *gyrA* che gli conferisce un livello di resistenza ad alte dosi di chemioterapico (ciprofloxacina MIC >16 µg/ml) (Luo *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2003; Ge *et al.*, 2005). Conseguentemente, in polli trattati con enrofloxacin tale mutazione avviene in maniera molto rapida, già dopo 24-48 ore dall'inizio del trattamento (Luo *et al.*, 2003; Takahashi *et al.*, 2005). A questo meccanismo di resistenza principale si aggiunge il contributo dato dalla pompa di efflusso *CmeABC* che provoca un'estromissione dell'antibiotico dalla cellula batterica stessa (Lin *et al.*, 2002; Luo *et al.*, 2003; Ge *et al.*, 2005). Tale evidenza suggerisce che *Campylobacter* è molto mutabile a seguito del trattamento degli animali con fluorochinoloni e che l'utilità terapeutica di questi chemioterapici può essere fortemente compromessa in seguito al precoce sviluppo della resistenza da parte del batterio.

Come si diceva in precedenza, un'altra classe di antibiotici utilizzata per combattere le infezioni alimentari provocate da *Campylobacter* è rappresentata

dai macrolidi, quali tilosina, eritromicina e tilmicosina. Negli Stati Uniti e in Canada la tilosina è frequentemente aggiunta al mangime a dosi sub-terapeutiche come agente promotore di crescita (Gyles, 2008). Sovente, si riscontrano batteri resistenti a tale classe antimicrobica con percentuali inferiori a quelle rinvenute per i fluorochinoloni: 6% negli Stati Uniti (NARMS 2006), 20% in Canada (Larkin *et al.*, 2006), 18% in Francia (Gallay *et al.* 2007), 1% in Olanda e 11% in Belgio (EFSA, 2011), 11% in Australia (Mifflin *et al.*, 2007). Interessante è uno studio compiuto da Ladely *et al.* (2007) in cui è stato misurato il livello di resistenza di ceppi di *Campylobacter* isolati da broiler alimentati con mangimi contenenti macrolidi a dose terapeutica e subterapeutica. I risultati hanno dimostrato una resistenza del 63% in *Campylobacter* isolati da animali cui era stata somministrata la dose di chemioterapico a livello subterapeutico e una resistenza dell'11% in *Campylobacter* isolati da animali che ricevevano il macrolide alla dose terapeutica.

La resistenza batterica ai macrolidi è mediata da tre meccanismi, caratterizzati da: modificazione della molecola antimicrobica, modificazione del sito *target* ed estrusione del farmaco mediante pompe di efflusso (Leclecq, 2002). In *Campylobacter* tuttavia sono stati osservati solo la modificazione del sito *target* e l'estrusione mediante pompe di efflusso (Payot *et al.*, 2006). La modificazione del sito *target* può verificarsi sia per una metilazione enzimo-mediata che per una mutazione puntiforme nel sito 23S rRNA e/o a livello delle proteine ribosomiali L4 e L22 (Cagliero *et al.*, 2006; Payot *et al.*, 2006). A questo meccanismo si aggiunge il sopracitato efflusso del farmaco, mediato da pompe di membrana *CmeABC*, secondo lo stesso meccanismo che avviene per i fluorochinoloni (Payot *et al.*, 2004; Cagliero *et al.*, 2005; Mamelli *et al.*, 2005; Gibreel *et al.*, 2007). In maniera simile a ciò che avviene per altri batteri, la mutazione *target* e l'efflusso mediato da pompe di efflusso conferisce a *Campylobacter* una cross-resistenza ai differenti principi attivi appartenenti alla classe dei macrolidi (eritromicina, claritromicina, azitromicina, tilosina) (Mamelli

et al., 2005; Gyles, 2008). È stata, inoltre, riportata una cross-resistenza tra macrolidi e lincosamidi, suggerendo che l'uso dei lincosamidi possa indurre lo sviluppo di una resistenza ai macrolidi in *Campylobacter* (Luangtongkum *et al.*, 2006). Precedentemente è stato ampiamente sottolineato che la somministrazione di fluorochinoloni in avicoli colonizzati da *Campylobacter* provochi in breve tempo lo sviluppo della resistenza a tali chemioterapici da parte del batterio stesso. Quando invece a polli colonizzati da *Campylobacter* viene somministrata tilosina a dosi da promotore di crescita, la resistenza ai macrolidi viene rilevata dopo parecchie settimane di esposizione, suggerendo che lo sviluppo della macrolido-resistenza necessita di un lungo processo di selezione da parte del batterio (Lin *et al.*, 2007; Luangtongkum *et al.*, 2009). Il basso numero di mutazioni spontanee e il lento processo di resistenza sviluppato possono spiegare perché *Campylobacter* macrolido-resistenti sono generalmente più rari rispetto a *Campylobacter* fluorochinoloni-resistenti (Zhang e Plummer, 2008).

Riportiamo infine gli interessanti risultati di uno studio olandese in cui Hess *et al.* (2007) hanno riscontrato una stagionalità nei livelli di resistenza (più alti nella stagione invernale, più bassi durante il periodo estivo) di *Campylobacter* isolati da pazienti umani infetti. Queste variazioni stagionali della sensibilità del batterio all'eritromicina e ai fluorochinoloni sono state spiegate dalla pressione selettiva risultante dalla terapia antimicrobica effettuata per combattere le infezioni respiratorie, più frequenti durante il periodo freddo dell'anno.

Un'altra classe di farmaci antimicrobici usati comunemente in terapia proprio in funzione del suo ampio spettro d'azione è rappresentato dalle tetracicline, quali clortetraciclina, ossitetraciclina e doxiciclina. Dati relativi alla sensibilità alle tetracicline di *Campylobacter* isolati da allevamenti avicoli riportano tuttavia alti livelli di resistenza: dal 47 al 99% negli Stati Uniti (NARMS, 2006; Son *et al.*, 2007), 63% in Canada (CIPARS, 2005), 57% in Francia (Avrai *et al.*, 2003), 9.4% in Slovenia (Bardon *et al.*, 2008). Il report EFSA del 2011 riporta per

l'anno 2009 percentuali di resistenza media alle tetracicline, nell'Unione Europea del 40% in *C. jejuni* e del 46% in *C. coli*.

In *Campylobacter* sono stati descritti due meccanismi implicati nello sviluppo dell'antibiotico-resistenza. Il primo meccanismo coinvolge una proteina protettiva ribosomiale denominata *Tet(O)* (Sougankoff *et al.*, 1987; Taylor *et al.*, 1987; Manavathu *et al.*, 1988), in grado di sciogliere il legame tra tetraciclina e complesso ribosomiale (Connell *et al.*, 2003). Il secondo meccanismo di resistenza alle tetracicline coinvolge il sistema di efflusso. Le pompe di efflusso *CmeABC* sono state individuate come causa della resistenza sia intrinseca che acquisita del batterio (Lin *et al.*, 2002; Pumdwe e Piddock, 2002; Gibreel *et al.*, 2007).

Rispetto ai fluorochinoloni, ai macrolidi e alle tetracicline, la resistenza di *Campylobacter* verso altri antimicrobici ha ricevuto meno attenzione. La resistenza del batterio agli aminoglicosidi è conferita da una modificazione enzimo-mediata del farmaco. Questo tipo di resistenza, di natura extracromosomiale, trasferibile e spesso multipla, rappresenta il più frequente e importante meccanismo d'inattivazione degli aminoglicosidi.

In *Campylobacter* sono stati descritti tre principali enzimi inattivanti: 3-aminoglicoside fosfotransferasi, 3,9-aminoglicoside adeniltransferasi e 6-aminoglicoside adeniltransferasi (Zhang *et al.*, 2008).

Per quanto concerne le β -lattamine, esse hanno una limitata efficacia nei confronti di *Campylobacter* e la resistenza a questa classe di antimicrobici sembra essere dovuta a una resistenza intrinseca del batterio stesso e alla produzione di β -lattamasi (Li *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2008)

Campylobacter, infine, possiede una resistenza intrinseca a un'ampia varietà di molecole antimicrobiche, come la bacitracina, la rifampicina, il trimethoprim e la vancomicina. I meccanismi alla base di tali resistenze sono tuttavia sconosciuti, ma l'ipotesi più probabile risiede nella bassa permeabilità della membrana batterica e nell'efflusso attivo del farmaco mediato da trasportatori di membrana (Zhang *et al.*, 2008).

Per quanto concerne l'antibiotico-resistenza, grande differenza di sensibilità è stata riscontrata tra *C. jejuni* e *C. coli*. *Campylobacter coli* isolati da polli e da altri animali si sono dimostrati più inclini a sviluppare resistenza verso i fluorochinoloni, i macrolidi o le tetracicline. Inoltre, questa specie si è dimostrata più sensibile a sviluppare resistenza verso più classi di antimicrobici, compresi i fluorochinoloni e i macrolidi (Aarestrup *et al.*, 1997; Desmonts *et al.*, 2004; Luangtongkum *et al.*, 2006). In uno studio compiuto in tacchini, D'lima *et al.* (2007) hanno identificato un fenotipo multi-resistente di *Campylobacter* isolato esclusivamente da carne di tacchino e rappresentato da *C. coli*. Sempre nello stesso studio, rispetto ai ceppi di *Campylobacter* isolati dai polli, quelli isolati dai tacchini sono risultati più frequentemente resistenti alla ciprofloxacina e all'eritromicina e sono stati rinvenuti ceppi multi-resistenti con maggiore frequenza rispetto ai broiler.

Oltre alla valutazione della sensibilità agli antimicrobici di *Campylobacter* termofili, isolati da allevamenti di tacchini, questo lavoro si è incentrato anche sulla ricerca degli integroni di classe 1 e di classe 2. Si ritiene quindi opportuno spendere alcune parole su queste strutture, al fine di rendere maggiormente chiara la comprensione del lavoro stesso.

Gli integroni sono una famiglia di elementi genetici potenzialmente mobili capaci di integrare ed esprimere geni per la resistenza alle molecole antimicrobiche (Hall e Collins, 1995). La loro localizzazione, non solo a livello cromosomico, ma anche in plasmidi e trasposoni, ha suggerito che gli integroni non sono elementi mobili di per sé, ma devono essere veicolati da altri elementi, acquisendo così la capacità di spostarsi da una cellula batterica ad un'altra (Bennett, 1999; Mazel, 2006).

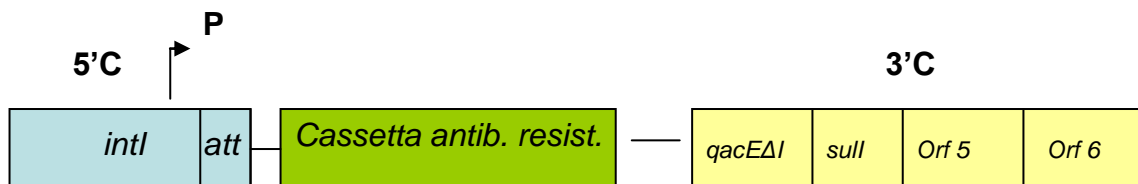
Sono quindi implicati in un meccanismo di trasferimento genetico di tipo orizzontale in cui le informazioni genetiche stesse, implicate nel fenomeno della resistenza agli antimicrobici vengono trasferite da un batterio donatore ad un batterio ricevente mediante coniugazione.

Gli integroni di classe 1 sono formati da due segmenti conservati alle estremità 5' e 3' (CS), lunghi rispettivamente 1,4 kb e 3 kb. Questi segmenti contengono una serie di elementi (figura 1) :

- un gene che codifica per l'integrasi (*intI*), un enzima responsabile dell'inserimento e dell'escissione delle cassette geniche nel sito di ricombinazione (Fluit e Schimtz, 1999);
- un sito di ricombinazione (*attI*) posto a valle del gene per l'integrasi, nel quale viene integrata la cassetta genetica di resistenza (Bennett, 1999);
- il promotore P_c e P₁, uno per l'espressione di *intI* e l'altro per l'espressione delle cassette geniche (Fluit e Schimtz, 1999);
- il gene *qacEΔI* che codifica la resistenza per i composti dell'ammonio quaternario e il gene *sulI* che codifica la resistenza al sulfametossazolo (Recchia e Hall, 1997; Bennett, 1999; Carattoli, 2001)

Si aggiungono infine due *open reading frame* (ORF), denominate ORF5 e ORF6, a funzione ancora sconosciuta.

Figura 1: schematizzazione della struttura base di un integrone



Negli integroni di classe 1 sono state descritte più di 80 differenti cassette geniche codificanti per un ampio numero di molecole antimicrobiche. Negli integroni di classe 2 invece il gene che codifica per l'integrasi (*intI2*) presenta una mutazione che comporta la trascrizione di una proteina non funzionale, responsabile del fatto che negli integroni di classe 2 sono state individuate solo 6 differenti cassette di resistenza (Ramirez *et al.*, 2005). L' integrazione e

l'escissione delle cassette geniche nell'integrone sembra quindi dipendere da un'altra integrasi.

Gli integroni costituiscono quindi un vantaggio selettivo per quei batteri che li posseggono, permettendo una maggiore resistenza e vitalità in quegli ambienti dove viene fatto largo uso degli antibiotici. Importante sottolineare anche la capacità di tali strutture di permanere nel corredo genetico di batteri isolati da ambienti in cui l'utilizzo di antimicrobici è scarso se non addirittura nullo, così come la persistenza al loro interno di cassette codificanti resistenze per antimicrobici ormai non più utilizzati, come la streptomina (Maguire *et al.*, 2001).

A differenza di altri batteri come *Escherichia coli* o *Salmonella*, in *Campylobacter* questi elementi genetici non sono comuni e non sembrano svolgere un ruolo importante nel trasferimento orizzontale dell'antibiotico-resistenza (Luangtongkum *et al.*, 2009). Gli integroni di classe 1, i più comuni integroni associati all'antibiotico-resistenza, sono stati segnalati sia in *C. jejuni* che in *C. coli* e sono principalmente implicati nel veicolare i geni per la resistenza agli aminoglicosidi (*aadA2* e *aacA4*) (Lee *et al.*, 2002; Ekkapobytin *et al.*, 2008).

Nel tacchino infine, non esiste nella bibliografia internazionale nessuno studio sulla ricerca di questi elementi genetici in *Campylobacter*, isolato da questa specie avicola.

2. SCOPO DEL LAVORO

Le specie termofile di *Campylobacter*, e principalmente *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli* sono i principali microrganismi responsabili di malattia alimentare nell'uomo. La campilobatteriosi si contrae per via alimentare attraverso il consumo di carni contaminate, crude o poco cotte o attraverso l'ingestione di acqua, contaminata dal batterio stesso. La carne avicola in particolare risulta un importante fonte di malattia. I monitoraggi effettuati negli allevamenti, al fine di determinare non solo la prevalenza, ma anche la sensibilità del batterio agli antimicrobici, sono stati svolti principalmente nel broiler. Grazie al valore economico di questo comparto è facile capire come probabilmente l'attenzione dei ricercatori si sia indirizzata, con maggiore frequenza, nello svolgimento di studi in questa specie. La bibliografia riguardante la sensibilità agli antimicrobici di *Campylobacter* isolati dal tacchino invece è molto scarsa, forse per il suo lungo ciclo produttivo che richiede tempi di monitoraggio elevati o forse per il suo interesse economico relativamente inferiore rispetto al broiler. Articoli sulla ricerca degli integroni in *Campylobacter* isolati da questa specie sono poco frequenti. Anche nel broiler studi su questa struttura genetica implicata nella trasmissione della resistenza alle molecole antimicrobiche sono scarsi.

Questo studio si propone quindi di ampliare le conoscenze sui profili di antibiotico-resistenza in *Campylobacter* termofili isolati dal tacchino, andando a testare non solo la sensibilità fenotipica del batterio alla molecola antimicrobica, ma anche indagando la presenza di importanti strutture molecolari implicate nello sviluppo e nel trasferimento della resistenza a determinate classi antimicrobiche. Tale monitoraggio risulta importante se non essenziale in un panorama di allevamento intensivo e consumo globale, nel quale oggi ci troviamo. Infatti, ceppi di *Campylobacter* resistenti o multi-resistenti possono facilmente raggiungere l'uomo provocando malattia e compromettendo l'utilizzo

delle uniche armi a nostra disposizione, gli antimicrobici. Risulta, quindi, ovvio il ruolo della ricerca nell'impedire la selezione di microrganismi particolarmente resistenti e il raggiungimento dell'uomo da parte degli stessi.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Raccolta dei campioni

Per questo studio sono stati utilizzati ceppi di *Campylobacter* stoccati presso il laboratorio di Microbiologia e Malattie Infettive del Dipartimento di Sanità Pubblica, Patologia Comparata e Igiene Veterinaria della Facoltà di Medicina Veterinaria dell'Università di Padova.

I ceppi erano stati stoccati in brodo peptone glicerolo con la seguente composizione: 25 ml di glicerolo sterile, 1,0 g di peptone, 0,5 g di NaCl, 75 ml di acqua distillata sterile; e poi congelati in *freezer* a una temperatura di -80° C.

I ceppi batterici utilizzati per lo studio dell'antibiotico-resistenza erano stati raccolti, mediante tamponi cloacali effettuati sistematicamente in tre allevamenti di tacchini (allevamento A, B e C) situati in Veneto, nella provincia di Vicenza. Gli animali erano stati monitorati dall'accasamento fino all'età di macellazione attraverso tamponi cloacali effettuati con cadenza settimanale fino alla positivizzazione e successivamente a tale evento con cadenza quindicinale. Nell'allevamento A erano stati isolati 124 ceppi batterici a diverse età: 17 ceppi a 14 giorni di età, 18 a 21 giorni, 17 a 42 giorni, 20 a 56 giorni, 19 a 70 giorni, 15 a 82 giorni. Nell'allevamento B erano stati isolati 72 ceppi: 17 a 91 giorni di età, 20 a 105 giorni, 20 a 119 giorni, 15 a 133 giorni. Nel gruppo C erano stati isolati 38 ceppi così distribuiti: 18 ceppi a 91 giorni di età e 20 a 105 giorni. In questa indagine erano stati isolati in totale 234 ceppi di *Campylobacter*, appartenenti alle specie *C. jejuni* e *C. coli*. Nell'allevamento A e nell'allevamento B era stata rilevata la presenza di entrambe le specie di *Campylobacter*, mentre nell'allevamento C erano stati isolati esclusivamente ceppi di *C. jejuni*.

3.2 Antibiogrammi e antibiotici utilizzati

Un campione statisticamente significativo (prevalenza attesa pari al 50%, livello di confidenza del 95%, errore tollerato del 7,5%) dei ceppi isolati durante i campionamenti è stato sottoposto ad antibiogramma secondo il metodo di diffusione in piastra di Kirby-Bauer (1966). In totale sono stati testati 100 isolati, 68 di *C. jejuni* e 32 di *C. coli*, corrispondenti a 7 o 8 ceppi per ciascun campionamento (circa 35%). Per l'allevamento A sono stati testati 56 ceppi: 26 *C. jejuni* e 30 *C. coli*. Per l'allevamento B sono stati testati 28 ceppi: 26 *C. jejuni* e 2 *C. coli*. Per l'allevamento C infine sono stati testati 16 *C. jejuni*.

I ceppi stoccati in congelatore sono stati rivitalizzati tramite semina su terreno *Tryptic Soy Agar* (OXOID, Basingstoke, UK) addizionato del 5% di sangue defibrinato di montone (OXOID) e successivamente incubati a 41,5 °C per 48 ore in condizioni di microaerofilia. Le condizioni di microaerofilia sono state ottenute in giare per anaerobiosi, mediante generatori *CampyGen* (OXOID). Una volta rivitalizzato il microrganismo sono state preparate sospensioni batteriche in soluzione fisiologica sterile con torbidità corrispondente allo 0,5 della scala McFarland, successivamente sono state inoculate in *Mueller-Hinton Agar* (OXOID) con l'aggiunta del 5% di sangue defibrinato di montone (OXOID). Le piastre sono state incubate a 41,5 °C per 48 ore in condizioni di microaerofilia. Come controllo positivo è stato utilizzato il ceppo *Campylobacter jejuni* ATCC 33560.

Sono state testate 21 molecole antimicrobiche appartenenti a 10 differenti classi:

- **Aminoglicosidi:** apramicina (15 µg) (OXOID), gentamicina (10 µg) (OXOID), streptomina (10 µg) (OXOID);
- **Cefalosporine:** cefalotina (30 µg) (OXOID), cefotaxime (30 µg) (OXOID), ceftiofur (30 µg) (OXOID), cefuroxime (30 µg) (OXOID);

- **Chinoloni e Fluorochinoloni:** acido nalidixico (30 µg) (OXOID), ciprofloxacina (5 µg) (OXOID), enrofloxacin (5 µg) (OXOID), flumequina (30 µg) (OXOID);
- **Fenicoli:** cloramfenicolo (30 µg) (OXOID);
- **Lincosamidi:** clindamicina (2 µg) (OXOID);
- **Macrolidi:** eritromicina (5 µg) (OXOID), tilmicosina (15 µg) (Bio-Rad, Marnes La Coquette, Francia), tilosina (30 µg) (Mast Diagnostic Ltd, Merseyside, UK);
- **Penicilline:** amoxicillina-acido clavulanico (30 µg) (OXOID), ampicillina (10 µg) (OXOID);
- **Sulfonamidi + Diaminopirimidine:** trimetoprim + sulfametossazolo (25 µg) (OXOID);
- **Tetracicline:** ossitetraciclina (30 µg) (OXOID);
- **Pleuromutiline:** tiamulina (30 µg) (Abtek Biologicals Ltd, Liverpool, UK).

I risultati sono stati interpretati secondo le indicazioni fornite dal *Clinical and Laboratory Standards Institute* (2007).

3.3 Estrazione del DNA

Il DNA batterico è stato estratto tramite bollitura per 20 minuti di un'ansata di patina batterica in 1 ml di acqua distillata.

3.4 Real-time PCR per la ricerca di integroni di classe 1 e 2

Tutti i 234 ceppi sono stati sottoposti a una fase di *screening* mediante *Sybr Green real-time PCR* per il rilievo della presenza di integroni di classe 1 e classe 2. In questo studio sono state utilizzate le coppie di *primer* oligonucleotidiche descritte da Ekkabyotin *et al.* (2008), disegnati sulle sequenze conservate dei geni *int1* e *int2*, codificanti per l'integrasi.

Le prove sono state eseguite nello strumento LightCycler® 480 *Real-Time PCR System* (Roche Diagnostics corporation) con la seguente miscela di reazione: *Quantitect Sybr Green PCR Master Mix 1X* (Qiagen, Hilden, Germany), 0,3 µM di ciascun *primer* e 100 ng di DNA batterico in un volume di reazione finale di 10 µl. Le condizioni di amplificazione prevedevano 40 ripetizioni del ciclo, caratterizzato da una fase di denaturazione a 94°C per 10 secondi, una fase di *annealing* dei *primer* a 55°C per 30 secondi ed una di estensione a 72°C per 30 secondi, precedute da un ciclo di pre-denaturazione a 95°C per 15 minuti.

Ad ogni reazione venivano aggiunti un controllo positivo e un bianco di reazione e le analisi dei risultati sono state condotte con il software *LightCycler 480 SW v1.5*

Tabella 1: primer oligonucleotidici utilizzati per la ricerca dei geni codificanti per l'integrasi

Primer	Gene target	Sequenza
Int1L-F	<i>Int1</i>	5'- TTG CAA ACC CTC ACT GAT -3'
Int1L-R	<i>Int1</i>	5'- CAG GAG ATC GGA AGA CCT -3'
Int2-R	<i>Int2</i>	5'- CGT GCT GGA GGG AAA GAC -3'
Int2-R	<i>Int2</i>	5'- CAT GAC GGT AAG GGT GGG -3'

3.5 Analisi dei dati

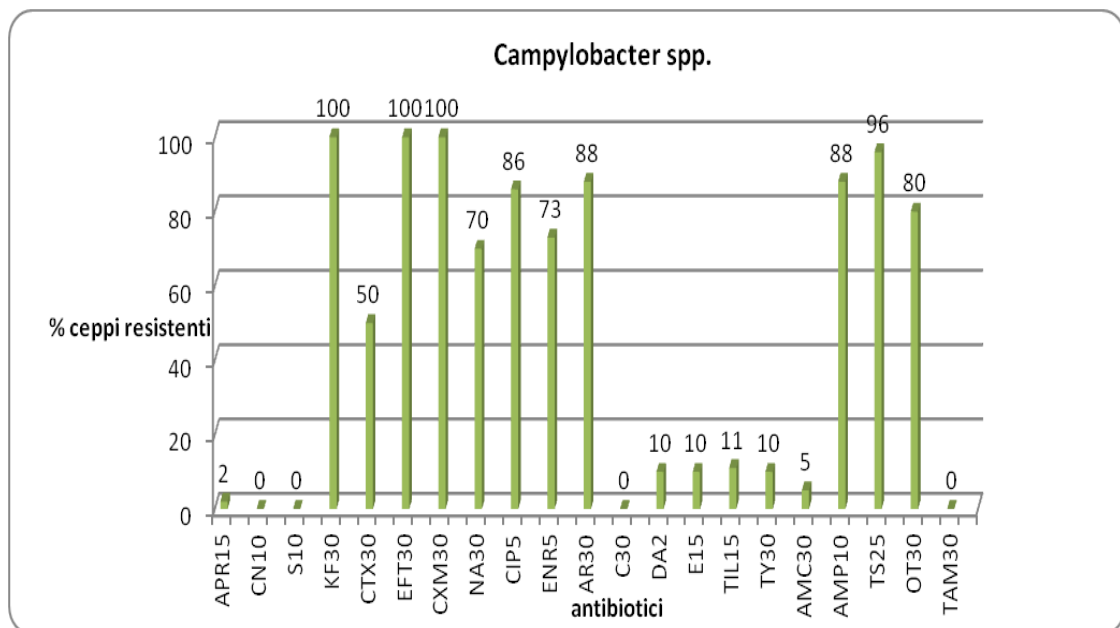
Per valutare le differenze nell'antibiotico-resistenza tra *C. jejuni* e *C. coli* e le differenze tra i batteri isolati in allevamenti diversi sono stati utilizzati i test del Chi-quadrato (χ^2) e il test esatto di Fisher. E' stata, inoltre, effettuata un'analisi di regressione logistica multivariata per valutare l'effetto delle specie di *Campylobacter* e dei gruppi di origine sulla resistenza a ciascuna molecola antimicrobica. Le differenze sono state considerate significative con un valore di $p < 0.05$.

4. RISULTATI

4.1 Antibiogrammi

Dall'analisi delle percentuali di resistenza agli antimicrobici di tutti i 100 ceppi di *Campylobacter* testati (Figura 2) sono evidenti alti livelli di resistenza del microrganismo verso determinate molecole.

Figura 2: percentuali dei ceppi resistenti ai diversi antimicrobici



APR15 apramicina, **CN10** gentamicina, **S10** streptomina, **KF30** cefalotina **CTX30** cefotaxime, **EFT30** ceftiofur, **CXM30** cefuroxime, **NA30** acido nalidixico, **CIP5** ciprofloxacina, **ENR5** enrofloxacina, **AR30** flumequina, **C30** cloramfenicolo, **DA2** clindamicina, **E15** eritromicina, **TIL15** tilmicosina, **TY30** tilosina, **AMC30** amoxicillina-acido clavulanico, **AMP10** ampicillina, **TS25** trimetoprim-sulfametossazolo, **OT30** ossitetraciclina, **TAM30** tiamulina

L'analisi dei ceppi, sul totale di quelli testati, ha evidenziato un'alta resistenza alle cefalosporine. Il 100% dei ceppi sono risultati resistenti alla cefalotina, al ceftiofur e al cefuroxime, mentre solo il 50% dei ceppi è risultato resistente al cefotaxime.

Alta resistenza è stata rilevata anche nei confronti dei chinoloni e dei fluorochinoloni, con percentuali superiori al 70% fino all'88% dei ceppi resistenti alla flumequina.

Per le penicilline, l'88% dei ceppi di *Campylobacter* ha mostrato resistenza per l'ampicillina, mentre solo il 5% dei ceppi testati è risultato resistente all'amoxicillina-acido clavulanico. Livelli di resistenza del 96% e dell'80% sono stati riscontrati verso il trimethoprim-sulfametossazolo e l'ossitetraciclina, rispettivamente.

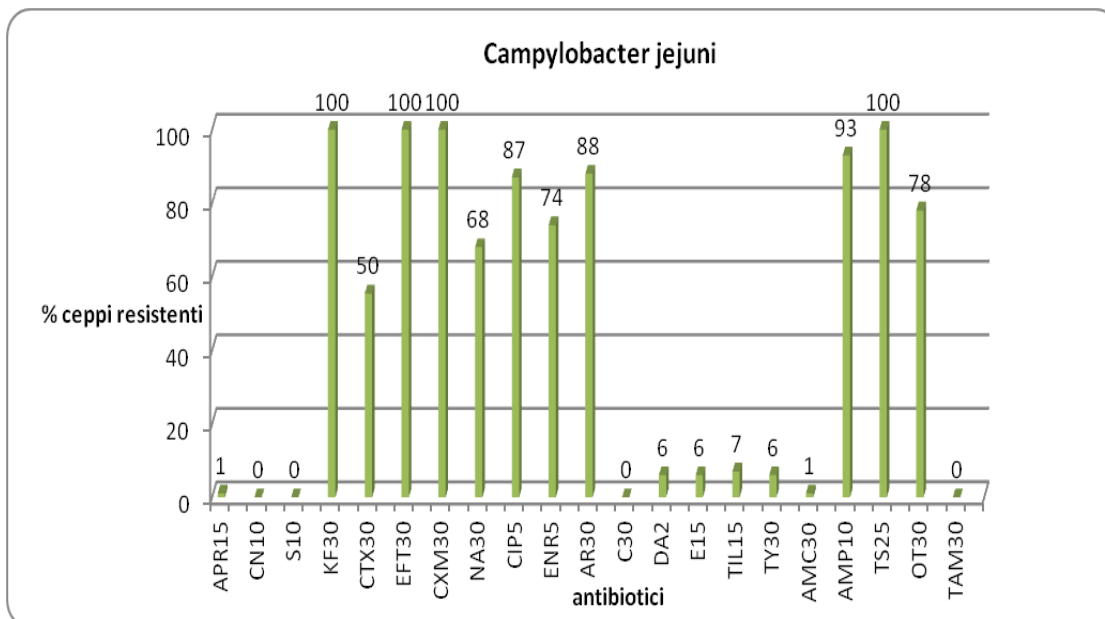
Un basso numero di ceppi testati (circa il 10%) è risultato resistente alla clindamicina.

Anche per i macrolidi una percentuale di circa il 10% dei ceppi è risultata resistente alle molecole antimicrobiche di questa classe.

Per gli aminoglicosidi solo 2 ceppi su 100 sono risultati resistenti all'apramicina, mentre non sono stati riscontrati ceppi resistenti ai fenicoli e alle pleuromotiline.

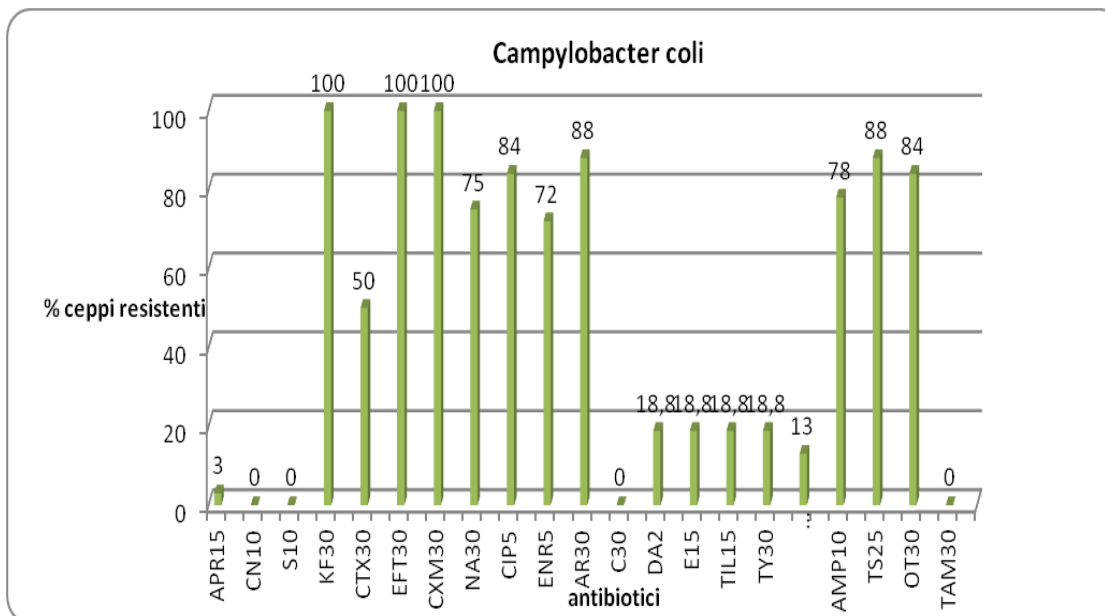
Nelle tabelle 2 e 3 sono illustrate le percentuali dei ceppi testati ai diversi antimicrobici, suddivisi in base alla specie di appartenenza.

Figura 3: percentuali di resistenza dei ceppi di *C. jejuni* ai diversi antimicrobici utilizzati



APR15 apramicina, **CN10** gentamicina, **S10** streptomina, **KF30** cefalotina **CTX30** cefotaxime, **EFT30** ceftiofur, **CXM30** cefuroxime, **NA30** acido nalidixico, **CIP5** ciprofloxacina, **ENR5** enrofloxacina, **AR30** flumequina, **C30** cloramfenicolo, **DA2** clindamicina, **E15** eritromicina, **TIL15** tilmicosina, **TY30** tilosina, **AMC30** amoxicillina-acido clavulanico, **AMP10** ampicillina, **TS25** trimetoprim-sulfametossazolo, **OT30** ossitetraciclina, **TAM30** tiamulina

Figura 4: percentuali di resistenza dei ceppi di *C. coli* ai diversi antimicrobici utilizzati

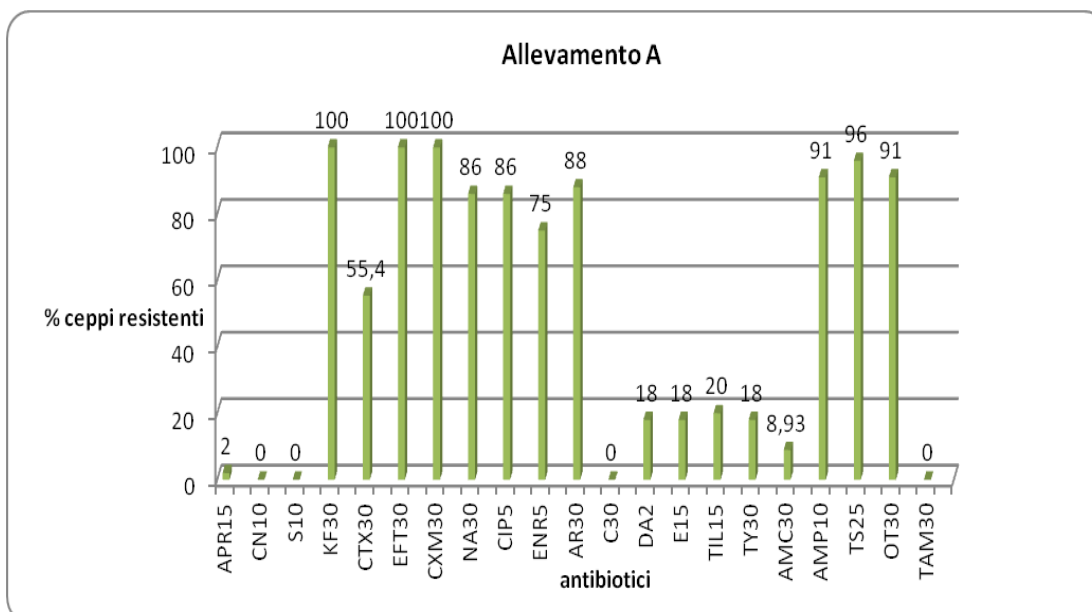


APR15 apramicina, **CN10** gentamicina, **S10** streptomina, **KF30** cefalotina **CTX30** cefotaxime, **EFT30** ceftiofur, **CXM30** cefuroxime, **NA30** acido nalidixico, **CIP5** ciprofloxacina, **ENR5** enrofloxacina, **AR30** flumequina, **C30** cloramfenicolo, **DA2** clindamicina, **E15** eritromicina, **TIL15** tilmicosina, **TY30** tilosina, **AMC30** amoxicillina-acido clavulanico, **AMP10** ampicillina, **TS25** trimetoprim-sulfametossazolo, **OT30** ossitetraciclina, **TAM30** tiamulina

Confrontando i risultati di resistenza tra *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli* si sono avuti risultati pressochè uguali, con una resistenza del 50% al cefotaxime e resistenza del 100% alle altre cefalosporine. In entrambe le specie risulta evidente un ampio numero di ceppi resistenti ai chinoloni e fluorochinoloni, con percentuali molto simili tra le due specie e superiori al 70%. La differenza più evidente è stata rilevata comparando le resistenze delle due specie all'acido nalidixico: *Campylobacter coli* è risultato più resistente al chemioterapico con una percentuale del 75%, a differenza di *Campylobacter jejuni* in cui i ceppi resistenti sono risultati il 68%. Per i macrolidi sono state rilevate percentuali maggiori di resistenza di *Campylobacter coli* rispetto a *Campylobacter jejuni*. Circa il 19% dei ceppi testati di *C. coli* sono risultati resistenti a eritromicina, tilosina e tilmicosina, mentre solo il 6% di *C. jejuni* sono risultati resistenti a tali molecole. Anche per la clindamicina, *C. coli* ha evidenziato minor sensibilità, con una percentuale di ceppi resistenti pari al 19% a differenza di *C. jejuni* in cui il 6% dei ceppi testati è risultato resistente. Tale dato è inoltre risultato statisticamente significativo, con valore di $p = 0.044$. Alta resistenza è stata riscontrata in entrambe le specie per l'ampicillina, con una differenza statisticamente significativa ($p = 0.049$). Per tale molecola la percentuale di ceppi di *C. jejuni* resistenti è risultata del 93%, mentre quella per *C. coli* del 78%. Anche per l'amoxicillina si è riscontrata una differenza di resistenza tra *C. jejuni* e *C. coli*, rispettivamente dell'1% e del 13%. Statisticamente significativa ($p = 0.009$) è risultata anche la differenza di resistenza tra le due specie ai sulfamidici. Il 100% dei ceppi di *Campylobacter jejuni* è risultato resistente al trimetoprim-sulfametossazolo, contro l'88% dei ceppi di *Campylobacter coli* risultato resistente a tale molecola. Nessuna differenza significativa è risultata nella resistenza delle due specie agli aminoglicosidi, fenicoli e pleuromutiline.

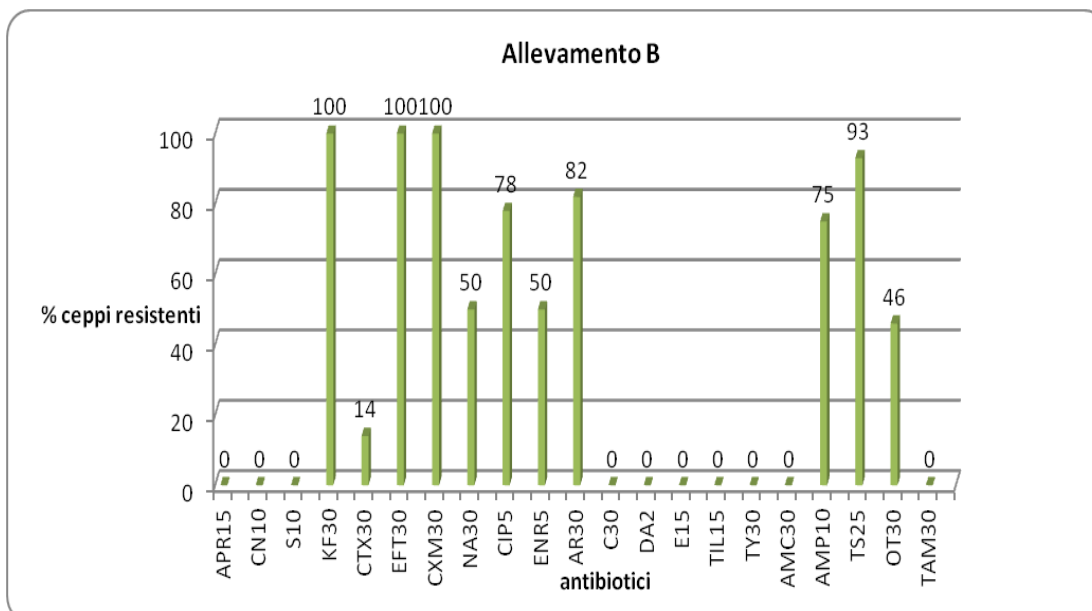
Analizziamo ora le percentuali dei ceppi resistenti agli antimicrobici testati a seconda dell'allevamento in cui i microrganismi sono stati isolati.

Figura 5: percentuali di resistenza di *Campylobacter* dell'allevamento A agli antimicrobici utilizzati



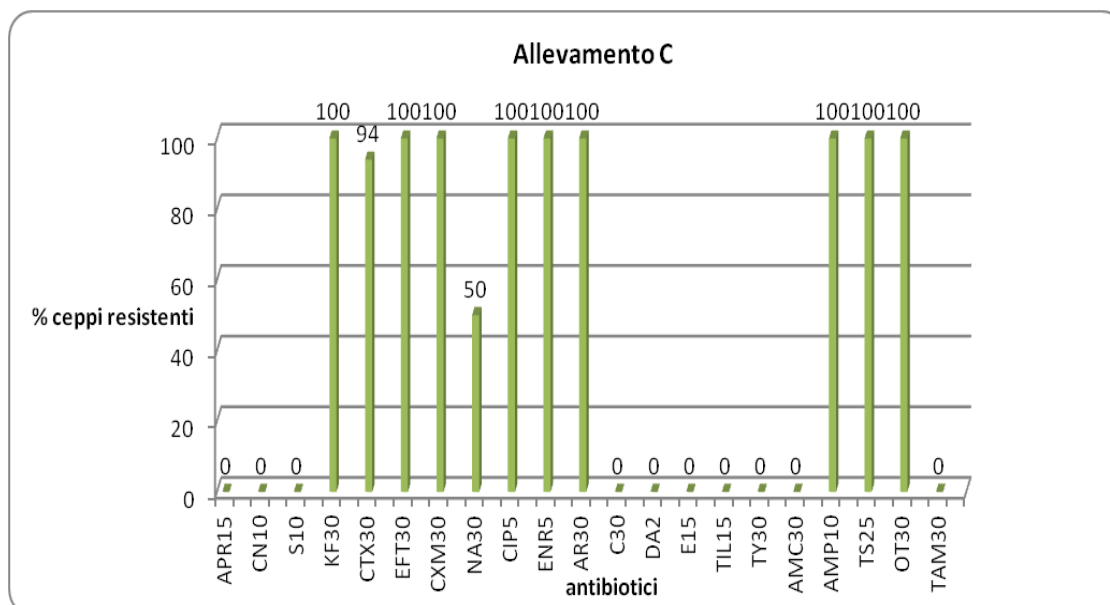
APR15 apramicina, CN10 gentamicina, S10 streptomina, KF30 cefalotina, CTX30 cefotaxime, EFT30 ceftiofur, CXM30 cefuroxime, NA30 acido nalidixico, CIP5 ciprofloxacina, ENR5 enrofloxacina, AR30 flumequina, C30 cloramfenicolo, DA2 clindamicina, E15 eritromicina, TIL15 tilmicosina, TY30 tilosina, AMC30 amoxicillina-acido clavulanico, AMP10 ampicillina, TS25 trimetoprim-sulfametossazolo, OT30 ossitetraciclina, TAM30 tiamulina

Figura 6: percentuali di resistenza di *Campylobacter* dell'allevamento B agli antimicrobici utilizzati



APR15 apramicina, CN10 gentamicina, S10 streptomina, KF30 cefalotina, CTX30 cefotaxime, EFT30 ceftiofur, CXM30 cefuroxime, NA30 acido nalidixico, CIP5 ciprofloxacina, ENR5 enrofloxacina, AR30 flumequina, C30 cloramfenicolo, DA2 clindamicina, E15 eritromicina, TIL15 tilmicosina, TY30 tilosina, AMC30 amoxicillina-acido clavulanico, AMP10 ampicillina, TS25 trimetoprim-sulfametossazolo, OT30 ossitetraciclina, TAM30 tiamulina

Figura 7: percentuali di resistenza di *Campylobacter* dell'allevamento C agli antimicrobici utilizzati



APR15 apramicina, **CN10** gentamicina, **S10** streptomicina, **KF30** cefalotina **CTX30** cefotaxime, **EFT30** ceftiofur, **CXM30** cefuroxime, **NA30** acido nalidixico, **CIP5** ciprofloxacina, **ENR5** enrofloxacin, **AR30** flumequina, **C30** cloramfenicolo, **DA2** clindamicina, **E15** eritromicina, **TIL15** tilmicosina, **TY30** tilosina, **AMC30** amoxicillina-acido clavulanico, **AMP10** ampicillina, **TS25** trimetoprim-sulfametossazolo, **OT30** ossitetraciclina, **TAM30** tiamulina

Comparando i risultati delle resistenze dei ceppi batterici, non si sono evidenziate marcate differenze di sensibilità ai diversi antimicrobici tra i vari allevamenti. Per le cefalosporine, i livelli di resistenza sono risultati alti in tutti e tre gli allevamenti. Per il cefotaxime, tuttavia, è stata rilevata una differenza nella resistenza dei ceppi testati. Tale differenza è risultata anche statisticamente significativa ($p < 0.0001$). Il 94% dei ceppi isolati nell'allevamento C ha dimostrato resistenza a tale molecola, mentre solo il 55,4% dei ceppi isolati dall'allevamento A e il 14% di quelli isolati dall'allevamento B ha dimostrato di essere resistente. Alti livelli di resistenza sono stati rilevati anche per i chinoloni e i fluorochinoloni. Nell'allevamento A, per tutti e quattro gli antimicrobici appartenenti a questa classe, le resistenze rilevate sono state superiori al 75% con un picco dell'88% di ceppi resistenti alla flumequina. Nell'allevamento B, invece, solo il 50% dei ceppi testati è risultato resistente all'acido nalidixico e all'enrofloxacin, mentre per le altre molecole la percentuale di resistenza è risultata vicina all'80%.

Nell'allevamento C, solo il 50% dei ceppi testati è risultato resistente all'acido nalidixico, mentre il totale dei ceppi si è dimostrato resistente per le altre molecole della stessa classe. La differenza di sensibilità all'acido nalidixico dei ceppi batterici nei tre diversi gruppi di origine è inoltre risultata statisticamente significativa con $p = 0.0005$, assieme alla differenza di sensibilità all'enrofloxacin, con $p = 0.014$. Come è facile desumere dai grafici una differenza di sensibilità nei diversi allevamenti è stata riscontrata anche per i macrolidi. Mentre i ceppi isolati dall'allevamento B e dall'allevamento C hanno dimostrato una totale sensibilità a questa classe di antimicrobici, i ceppi di *Campylobacter* appartenenti all'allevamento A hanno dimostrato una resistenza variabile tra il 18 e il 20% per eritromicina, tilosina e tilmicosina. Risultato simile è stato ottenuto per la clindamicina, per la quale solo il 18% dei ceppi batterici appartenenti all'allevamento A ha dimostrato di essere resistente.

Analizzando il comportamento dei microrganismi nei confronti delle penicilline è risultata una differenza statisticamente significativa nella resistenza del batterio nei confronti dell'ampicillina ($p = 0.027$). Per tale molecola, il 91% e il 100% dei ceppi appartenenti rispettivamente all'allevamento A e all'allevamento C ha dimostrato di essere resistente, mentre nell'allevamento B il 75% dei ceppi testati ha dimostrato tale proprietà. Per l'associazione amoxicillina-acido clavulanico, solo il 9% circa dei microrganismi testati, isolati dall'allevamento A ha dimostrato una resistenza all'antimicrobico, mentre nessuna resistenza è risultata nei ceppi appartenenti ai restanti allevamenti. Statisticamente significativo è risultato il dato di resistenza per l'ossitetraciclina con valore di $p < 0.0001$. Nell'allevamento C solo il 46% dei ceppi testati si è dimostrato resistente a tale antimicrobico, a differenza di percentuali di resistenza pari al 91% e al 100%, rispettivamente negli allevamenti A e C. Percentuali di resistenza molto vicine al 100% si sono avute per i sulfamidici in tutti e tre gli allevamenti. Nei ceppi dei tre allevamenti esaminati, nessuna resistenza è stata rilevata per il cloramfenicolo, per la tiamulina e per la quasi totalità degli

aminoglicosidi. Per l'apramicina solo il 2% dei ceppi testati isolati nell'allevamento A è risultato resistente.

Il modello di regressione logistica multivariata, costruito per valutare l'effetto delle specie di *Campylobacter* e dei gruppi (allevamenti d'origine) sulla resistenza a ciascuna molecola, ha rilevato un effetto del gruppo solo sulla resistenza all'acido nalidixico e all'ossitetraciclina.

Nelle tabelle 7 e 8 sono riportati i *pattern* di multi-resistenza riscontrati nei *Campylobacter* testati. Nella prima tabella sono elencati i diversi profili di resistenza differenziandoli per allevamento, nella seconda tabella sono differenziati secondo la specie.

Tabella 2: principali pattern di antibiotico-resistenza in *Campylobacter* a seconda dell'allevamento di origine

N° classi componenti il pattern di multi-resistenza	Pattern antibiotico-resistenza	N° isolati allevamento A	N° isolati allevamento B	N° isolati allevamento C
1	C	1		
2	C/SL	3	5	
3	C/F/Tr		2	
3	C/F/SI	1		
4	C/F/P/SI		7	
5	C/F/P/SI/Tr	37	14	16
6	C/F/Ln/P/SI/Tr	2		
6	C/F/Ma/P/SI/Tr	1		
7	C/F/Ln/P/Ma/SI/Tr	10		
8	A/C/F/Ln/Ma/P/SI/Tr	1		

A aminoglicosidi, **C** cefalosporine, **F** chinoloni e fluorochinoloni, **P** penicilline, **Tr** tetracicline, **SI** sulfamidici, **Ln** lincosamidi, **PI** pleuromutiline, **Ma** macrolidi, **Fn** fenicoli

Tabella 3: principali pattern di antibiotico-resistenza in *Campylobacter* a seconda della specie di appartenenza

N° classi componenti il pattern di multi-resistenza	Pattern antibiotico-resistenza	N° <i>Campylobacter jejuni</i>	N° <i>Campylobacter coli</i>
1	C		1
2	C/SL	5	3
3	C/F/Tr		2
3	C/F/SI		1
4	C/F/P/SI	7	
5	C/F/P/SI/Tr	48	19
6	C/F/Ln/P/SI/Tr	2	
6	C/F/Ma/P/SI/Tr	1	
7	C/F/Ln/P/Ma/SI/Tr	5	5
8	A/C/F/Ln/Ma/P/SI/Tr		1

A aminoglicosidi, **C** cefalosporine, **F** chinoloni e fluorochinoloni, **P** penicilline, **Tr** tetracicline, **SI** sulfamidici, **Ln** lincosamidi, **PI** pleuromutiline, **Ma** macrolidi, **Fn** fenicoli

Come si evince dalla tabella 7, in tutti e tre gli allevamenti la quasi totalità (99%) dei ceppi microbici testati è risultata multi-resistente, cioè resistente a due o più classi antimicrobiche. In questo caso i ceppi isolati presentavano una resistenza variabile tra 2 e 8 classi antimicrobiche. Il *pattern* di resistenza più comune e riscontrato in tutti e tre i gruppi di tacchini comprendeva 5 classi, cioè cefalosporine-chinoloni-penicilline-sulfamidici-tetracicline. Nell'allevamento A il secondo *pattern* di resistenza per frequenza è risultato quello cefalosporine-chinoloni-lincosamidi-macrolidi-sulfamidici-tetracicline, mentre nell'allevamento B secondi per frequenza sono risultati i *pattern* di resistenza cefalosporine-sulfamidici e cefalosporine-chinoloni-penicilline-sulfamidici. Nell'allevamento C in tutti i 16 ceppi batterici isolati è stato rilevato un solo pattern di resistenza a 5 classi antimicrobiche: cefalosporine-chinoloni-penicilline-sulfamidici-tetracicline. Analizzando i profili di multi-resistenza in base alla specie di appartenenza, il *pattern* più frequente sia in *Campylobacter jejuni* che in *Campylobacter coli* è risultato cefalosporine-chinoloni-penicilline-sulfamidici-tetracicline. Secondi per frequenza in *C. jejuni* sono risultati i *pattern* cefalosporine-sulfamidici, cefalosporine-penicilline-sulfamidici e cefalosporine-chinoloni-lincosamidi-

penicilline-macrolidi-sulfamidici-tetracicline. In *Campylobacter coli* il secondo profilo di antibiotico-resistenza più frequente è risultato cefalosporine-chinoloni-lincosamidi-penicilline-macrolidi-sulfamidici-tetracicline. È, inoltre, da sottolineare che sempre in *Campylobacter coli* un ceppo ha dimostrato una resistenza a ben 8 delle 10 classi antibiotiche testate, con il *pattern* aminoglicosidi-cefalosporine-chinoloni-lincosamidi-penicilline-macrolidi-sulfamidici-tetracicline.

4.2 Integroni di classe 1 e 2

La ricerca mediante *real-time* PCR dei geni che codificano per l'integrasi ha dato esito negativo in tutti i 234 ceppi microbici isolati dai tre allevamenti. Quindi, in nessun ceppo batterico è stata rilevata la presenza di integroni.

5. DISCUSSIONE

Campylobacter è considerato la causa principale di gastroenteriti batteriche nei paesi industrializzati e in quelli in via di sviluppo. Nella sola Unione Europea per l'anno 2009 sono stati segnalati quasi 200.000 casi di campilobatteriosi nell'uomo, sostenute principalmente dalle specie *C. jejuni* e da *C. coli* (EFSA 2011). La maggior parte delle infezioni sostenute da questo microrganismo non necessita dell'utilizzo di farmaci antimicrobici, tendendo a risolversi in maniera spontanea. Tuttavia in un cospicuo numero di pazienti, *Campylobacter* può causare complicazioni il cui livello di gravità può essere addirittura rappresentato dalla morte. In questo caso l'utilizzo di farmaci antimicrobici risulta necessario. I principali farmaci che rappresentano la prima scelta d'impiego sono i macrolidi e i fluorochinoloni. I macrolidi sono generalmente utilizzati dopo la diagnosi microbiologica dell'agente eziologico, mentre i fluorochinoloni sono utilizzati come trattamento empirico di pazienti adulti con sospetto di gastroenterite batterica.

Per quanto riguarda i fluorochinoloni nel nostro studio sono state testate 4 molecole: l'acido nalidixico, la flumequina, la ciprofloxacina e l'enrofloxacina. Le percentuali di resistenza a tali molecole sono risultate elevate, superiori al 70%, e questo rilievo non si discosta dai risultati riportati da altri studi condotti in altri Paesi. Nel 2009 un *report* EFSA-ECDC (EFSA 2011) ha riportato percentuali di resistenza ai fluorochinoloni pari al 76,5% in Spagna, 36,8% ne Regno Unito e 59,4% in Italia. Quest'ultimo dato proveniva da un campione di 108 *Campylobacter* isolati da broiler. Pezzotti *et al.* (2002), monitorando allevamenti avicoli nel nord-est dell'Italia, hanno rilevato alte percentuali di resistenza verso i fluorochinoloni, con una netta differenza fra le due specie di *Campylobacter*. Infatti, *C. coli* (75%) ha dimostrato di essere nettamente più resistente di *C. jejuni* (45%) a questa classe di antimicrobici. Una differenza di sensibilità fra le specie, invece, non è stata rilevata nel nostro studio. Infatti, le percentuali di resistenza ai fluorochinoloni tra *C. jejuni* e *C. coli* si sono dimostrate molto

simili, a differenza di quanto viene riportato in altri studi (Pezzotti et al., 2003; Luangtongkum et al., 2006).

La resistenza di *Campylobacter* ai fluorochinoloni rappresenta un importante problema di Sanità Pubblica. È stato rilevato che lo sviluppo della resistenza a questa classe antimicrobica sembra essere dovuto all'utilizzo di queste molecole negli allevamenti animali a dosi sub-terapeutiche, e quindi a scopo metafilattico (EFSA, 2009). In Paesi come l'Australia, dove i fluorochinoloni non sono utilizzati come antimicrobici negli allevamenti, non sono mai stati rinvenuti *Campylobacter* resistenti a tali chemioterapici (Miflin et al., 2007). Paragonando invece sistemi di allevamento biologici, nei quali non sono utilizzati antimicrobici, ad allevamenti convenzionali, dove invece sono utilizzati, è stata evidenziata la presenza di *Campylobacter* sensibili ai fluorochinoloni nella prima tipologia di allevamento, cosa che invece non è stata rilevata negli allevamenti convenzionali (Lungrongkum et al., 2006). Risulta, quindi, priva di dubbi la stretta correlazione esistente tra l'utilizzo di tale classe di farmaci antimicrobici nell'allevamento avicolo e lo sviluppo della resistenza nel batterio. Per i fluorochinoloni il meccanismo di sviluppo della resistenza al farmaco è molto rapido. Come già ricordato in precedenza, in presenza della molecola in *Campylobacter* avviene una mutazione puntiforme del gene *gyrA* che codifica per la DNA girasi, principale bersaglio dei fluorochinoloni (Lungtongkum et al., 2009). Nelle specie avicole trattate con molecole appartenenti a tale classe antimicrobica, *Campylobacter* che hanno subito la mutazione, e quindi chinolono-resistenti, possono essere rinvenuti nelle feci degli animali anche già dopo 24 ore dall'inizio del trattamento, colonizzando successivamente tutto il tratto gastro-enterico dell'animale (Luo et al., 2003). Questa mutazione, non solo conferisce a *Campylobacter* una resistenza a una determinata classe di antimicrobici, ma influenza la fisiologia del batterio stesso e conseguentemente anche la sua adattabilità ad ambienti *antibiotic-free*. Infatti, *Campylobacter* chinolono-resistenti possono colonizzare l'animale in maniera persistente senza perdere la resistenza fenotipica e quindi senza perdere la mutazione che

conferisce resistenza anche quando termina la pressione selettiva indotta dall'antimicrobico. Studi *in vitro* e in broiler infettati con *Campylobacter* resistenti ai fluorochinoloni, hanno dimostrato che la mutazione associata alla resistenza non provoca una diminuzione della *fitness* del batterio, anzi un aumento, permettendo al batterio di competere con i microrganismi suoi simili senza mutazione e quindi sensibili alla classe antimicrobica (Luo *et al.*, 2005). Un altro dato di particolare interesse risiede nella scoperta che *Campylobacter* chinolono-resistenti rimangono prevalenti negli animali dell'allevamento avicolo fino a 4 anni dopo il cessato utilizzo di questa classe di antimicrobici (Price *et al.*, 2005; Gu *et al.*, 2008).

L'alto livello di resistenza ai fluorochinoloni riscontrato nei ceppi di *Campylobacter* esaminati nel nostro lavoro e provenienti da tre allevamenti di tacchini da carne può avere due principali spiegazioni. La prima potrebbe risiedere nell'utilizzo in allevamento di molecole appartenenti a questa classe di antimicrobici, utilizzo che, come detto precedentemente, può essere stato effettuato anche solo per un breve periodo di tempo, inducendo la mutazione a livello del batterio e successivamente permettendo la colonizzazione degli animali da parte dello stesso. Altro evento potrebbe essere la possibile infezione degli animali da parte di batteri già resistenti, che hanno colonizzato il gruppo dopo essere entrati in allevamento tramite vettori, quali uccelli selvatici, mosche, animali domestici (ad es. cane), oppure tramite personale di allevamento. Quest'ultima ipotesi, se potesse essere validata, rappresenterebbe un'ulteriore conferma della maggiore capacità di adattamento e di sopravvivenza in ambienti *antibiotic-free* di *Campylobacter* portatori della mutazione e quindi resistenti ai fluorochinoloni. I dati a nostra disposizione tuttavia, non ci permettono di validare nessuna delle due possibili ipotesi formulate, non essendo a conoscenza delle terapie effettuate e quindi dei farmaci antimicrobici utilizzati nei tre allevamenti esaminati.

I macrolidi, come i fluorochinoloni, sono i farmaci antimicrobici maggiormente utilizzati per il trattamento della campilobatteriosi nell'uomo. Nel nostro studio i

ceppi di *Campylobacter* esaminati hanno presentato una resistenza a tali farmaci sensibilmente minore rispetto a quella rilevata per i fluorochinoloni. *Campylobacter jejuni* ha presentato una resistenza inferiore al 10% verso tutte le molecole testate, mentre *C. coli* ha presentato una sensibilità minore per tale classe antimicrobica, con percentuali di ceppi resistenti pari a circa il 20%. Tali risultati si presentano in linea con quanto riportato in numerosi studi condotti in altri Paesi. L'EFSA ha riportato una resistenza del batterio ai macrolidi del 12% in Spagna e dell'11% in Italia (2007), mentre Mikulicova *et al.* hanno riportato il 14% in Repubblica Ceca (2005). In Australia, Miflin *et al.* (2006) hanno segnalato una resistenza dell'11%, mentre negli Stati Uniti i livelli di resistenza si sono attestati tra l'1% e il 3% (Gupta *et al.*, 2004). Nel nostro studio è stato, inoltre, rilevato un diverso livello di resistenza tra le due specie batteriche, con una maggiore resistenza ai macrolidi di *C. coli* rispetto a *C. jejuni*. Anche questo dato è in linea con quanto riportato in altri studi internazionali. Sempre Miflin *et al.* (2006), in Australia, hanno rilevato nei broiler solo *C. coli* resistenti ai macrolidi, mentre *C. jejuni* è sempre risultato sensibile a tale classe antimicrobica. Anche Pezzotti *et al.* (2002) hanno rilevato in Italia una maggior resistenza di *C. coli* isolati da broiler, maiali, vacche e uomini, rispetto a *C. jejuni*. Situazione simile è stata riportata in Giappone nello studio di Chuma *et al.* (2001), nel quale *C. jejuni* e *C. coli* isolati da broiler tra il 1992 e il 1999 hanno dimostrato una differenza considerevole di resistenza all'eritromicina, risultata maggiore per *C. coli*.

La resistenza ai macrolidi, come per i fluorochinoloni, è indotta dall'utilizzo di questa classe antimicrobica a dosi sub-terapeutiche negli allevamenti (Ladely *et al.*, 2007). Negli Stati Uniti e in Canada, ad esempio, l'utilizzo di questa classe antimicrobica, e in particolare della tilosina aggiunta al mangime come promotore di crescita, è di uso comune (Gyles *et al.*, 2008). L'utilizzo della tilosina, inoltre, provoca una resistenza crociata del batterio anche verso l'eritromicina, agendo le due molecole antimicrobiche a livello dello stesso *target* ribosomiale del batterio (Schlunzen *et al.*, 2001).

La resistenza ai macrolidi in *Campylobacter* è principalmente associata a un efflusso attivo della molecola e a modificazione del sito *target* (Cagliero *et al.*, 2006). La modificazione del *target* ribosomiale che permette lo sviluppo della resistenza batterica può avvenire tramite metilazione enzimo-mediata o mediante mutazione puntiforme del sito 23S rRNA e/o delle proteine ribosomiali L4 e L22 (Zhang e Plummer, 2008). Contrariamente a quanto avviene per i fluorochinoloni, la frequenza delle mutazioni che inducono la resistenza ai macrolidi in *Campylobacter* è di circa 100.000 volte inferiore rispetto a quanto avviene per i fluorochinoloni (Lin *et al.*, 2007). L'acquisizione della mutazione del sito *target* 23S rRNA sembrerebbe, infatti, richiedere una prolungata esposizione alla molecola antimicrobica, suggerendo che altre mutazioni dovrebbero avvenire prima di una vera e propria modificazione del sito ribosomiale *target*. La resistenza ai macrolidi in *Campylobacter* si sviluppa, quindi, molto più lentamente rispetto a quanto avviene per i fluorochinoloni. Lin *et al.* (2007), trattando con tilosina volatili infetti, hanno rilevato che i batteri sviluppavano resistenza per l'eritromicina non prima di tre trattamenti con il farmaco. Quando invece a uccelli positivi a *Campylobacter*, la molecola antimicrobica viene somministrata giornalmente a dosi sub-terapeutiche, solo dopo molte settimane si isolano dagli animali batteri resistenti all'eritromicina (Lin *et al.*, 2007). Tale evento suggerisce che la concentrazione dell'antimicrobico svolge un ruolo importante sui tempi di sviluppo dell'antibiotico-resistenza da parte di *Campylobacter*.

La mutazione, che comporta lo sviluppo della resistenza ai macrolidi in *Campylobacter*, comporta a sua volta una diminuzione della *fitness* del batterio. Gli aumentati costi di sopravvivenza nei batteri portatori della mutazione inducono, nel tratto gastro-enterico dell'ospite, una competizione con i batteri sensibili (e quindi non mutati) (Lungtongkum *et al.*, 2009). Questi ultimi risultano maggiormente adattabili, una volta cessata la pressione selettiva indotta dalla classe antimicrobica e quindi successivamente prevalgono rispetto ai batteri resistenti. Questa evidenza è supportata da studi di sorveglianza

effettuati in Danimarca, dove la riduzione dell'uso della tilosina a scopo metafilattico nei suini ha portato ad una significativa riduzione del numero di *Campylobacter* resistenti isolati da tali animali (Aaestrup *et al.*, 2008).

Nel nostro studio, effettuato in tre allevamenti di tacchini, solo nell'allevamento A sono stati isolati *Campylobacter* con un livello di resistenza ai macrolidi pari a circa il 20%. Tale situazione potrebbe suggerire un uso di tale classe antimicrobica nell'allevamento stesso. Le caratteristiche temporali dello sviluppo della farmaco-resistenza da parte del batterio e la successiva perdita della stessa, una volta cessata la pressione selettiva del farmaco, suggeriscono che l'utilizzo dei macrolidi nel suddetto allevamento non si sarebbe limitato ad un singolo trattamento e che il cessato utilizzo dell'antimicrobico sarebbe avvenuto non molto tempo prima del prelievo dei nostri campioni. Non siamo a conoscenza tuttavia dei trattamenti antimicrobici effettuati in allevamento a causa dell'indisponibilità da parte degli allevatori di comunicare tali dati. Sempre nello stesso allevamento è stata rilevata una resistenza da parte di *Campylobacter* verso la clindamicina, antimicrobico appartenente alla classe dei lincosamidi. Tale evidenza tuttavia non stupisce, essendo riportata una cross-resistenza tra macrolidi e lincosamidi in questo batterio (Luangtongkum *et al.*, 2006), suggerendo anche la possibilità che l'utilizzo della clindamicina possa indurre una resistenza di *Campylobacter* verso i macrolidi. Questa cross-resistenza sembra essere legata al fatto che entrambe le classi antimicrobiche interagiscono con la stessa sub-unità ribosomiale batterica. Come precedentemente ribadito tuttavia, non avendo a disposizione informazioni sull'utilizzo di antimicrobici negli allevamenti esaminati non è possibile formulare ipotesi concrete.

Le tetracicline, nonostante il loro ampio spettro d'azione, non rappresentano la classe antimicrobica di prima scelta per il trattamento delle infezioni da *Campylobacter*, a causa della loro elevata concentrazione inibente richiesta ($MIC_{90} > 64 \mu\text{g/ml}$) e a causa della scarsa sensibilità del batterio a tali molecole (Belloli, 2009). I livelli di resistenza rilevati a livello mondiale sono abbastanza

variabili, ma comunque si attestano ad alti livelli. Negli Stati Uniti Son *et al.* (2007) hanno rilevato il 99% di ceppi resistenti, mentre il NARMS (2006) ha rilevato il 47% di resistenza. In Francia, Avrain *et al.* (2003) hanno rilevato una resistenza alle tetracicline del 57%, mentre in Italia Pezzotti *et al.* (2002) hanno rilevato nei broiler una resistenza del 25% in *C. jejuni* e del 75% in *C. coli*. La resistenza alla classe antimicrobica rilevata nel nostro studio è risulta molto elevata: quasi il 100% in due allevamenti e il 46% nel terzo allevamento, rimanendo quindi in linea con i risultati riportati dagli altri studi. Non sono state, tuttavia, rilevate differenze di resistenza tra le due specie batteriche esaminate. La resistenza di *Campylobacter* verso questa classe antimicrobica è dovuta a un sistema di efflusso del farmaco tramite pompe di membrana e a una proteina di produzione batterica a funzione protettiva. Tale proteina, denominata *tet(O)* induce una modificazione conformazionale del complesso ribosomiale con conseguente rilascio della molecola antimicrobica (Zhang e Plummer, 2008).

In tutti e tre gli allevamenti esaminati è stata rilevata una quasi totale sensibilità dei ceppi agli aminoglicosidi. Solo una piccola percentuale di *Campylobacter* isolati si è dimostrata resistente all'apramicina, in assenza di differenze fra le specie. Diversi studi riportano risultati molto variabili per questa classe antimicrobica. Ad esempio, Pezzotti *et al.* (2003) ha riportato in Italia percentuali di resistenza dell'1,5% alla gentamicina in *Campylobacter* isolati da broiler, mentre Saenz *et al.* (1999) hanno riportato in Spagna, sempre nei broiler, livelli ben maggiori di resistenza, con percentuali fino all'80% e con una netta differenza di sensibilità tra *C. jejuni* e *C. coli*.

Gli aminoglicosidi sono una classe di antibiotici scarsamente efficaci nei confronti di batteri anaerobi. Il meccanismo tramite il quale questi farmaci penetrano all'interno del citoplasma batterico è, infatti, energia-dipendente e dipende dalla produzione di ATP tramite fosforilazione ossidativa che necessita quindi della presenza di ossigeno (Jana e Deb, 2006). I bassi livelli di ossigeno

richiesti per la sopravvivenza di *Campylobacter* sarebbero comunque sufficienti per permettere il passaggio della molecola attraverso la membrana batterica.

L'emergenza per la resistenza alla gentamicina di *Campylobacter*, isolati da animali, per produzioni alimentari, potrebbe essere correlata all'utilizzo dell'apramicina (strutturalmente simile alla gentamicina) per i trattamenti in ambito veterinario e quindi allo sviluppo di una cross-resistenza per le due molecole. La resistenza verso questa classe di antimicrobici è dovuta a una serie di meccanismi che comprendono: efflusso del farmaco tramite pompe di membrana; diminuzione della permeabilità della membrana batterica; modificazione del sito *target*; e modificazione del farmaco. Il meccanismo più importante tuttavia è rappresentato da una modificazione enzimatica della molecola antimicrobica, mediata dagli enzimi 3-aminoglicoside fosfotransferasi, 3,9-aminoglicoside adeniltransferasi e 6-aminoglicoside adeniltransferasi (Zhang e Plummer, 2008).

Campylobacter resistenti al cloramfenicolo sono isolati raramente, anche se un gene che codifica per un'acetiltransferasi e che conferisce resistenza a tale molecola tramite modificazione enzimatica della stessa, è stato segnalato in plasmidi di *C. coli* (Tayler e Tracz, 2005). Nel nostro studio, in nessuno dei tre allevamenti sono stati isolati ceppi di *Campylobacter* resistenti al cloramfenicolo. L'uso di tale farmaco negli animali destinati alle produzioni alimentari è stato vietato dall'Unione Europea nel 1994 (Reg CE 1430/94). Tale evidenza potrebbe suggerire un mancato sviluppo della resistenza batterica al farmaco a causa dell'assenza di pressione selettiva indotta da tale molecola, per un periodo di tempo particolarmente lungo.

La resistenza alle β -lattamine ha suscitato nei vari studi internazionali minore interesse rispetto ad altre classi antimicrobiche, come i fluorochinoloni. Per le penicilline e le cefalosporine, infatti, *Campylobacter* presenta una resistenza intrinseca dovuta alla produzione di β -lattamasi, enzimi di produzione batterica che inattivano la molecola antimicrobica provocando un'idrolisi dell'anello β -lattamico (Zhang e Plummer, 2008). I livelli di resistenza rilevati nei tre

allevamenti di tacchini monitorati nel nostro studio risultano, infatti, elevati sia per le penicilline sia per le cefalosporine, ad eccezione dell'associazione amoxicillina-acido clavulanico. L'acido clavulanico, tuttavia, è utilizzato per la sua proprietà di legarsi alle β -lattamasi, inattivandole. La bibliografia internazionale ha riportato tuttavia dati che solo parzialmente sono in accordo con quelli rilevati nel nostro studio. Pezzotti *et al.* (2003) e Saenz *et al.* (1999) hanno riportato, in Italia e in Spagna rispettivamente, livelli di resistenza del 100% alla cefalotina in *Campylobacter* isolati da broiler. Per l'ampicillina, invece, Saenz *et al.* (1999) hanno riportato in Spagna livelli di resistenza del 19%, Miflin *et al.* (2007) del 17.6% in Australia e Bardon *et al.* (2008) del 26,4% in Repubblica Ceca, in ceppi di *Campylobacter* isolati da broiler. Robin *et al.* (2008) hanno invece riportato per l'ampicillina livelli di resistenza del 97,5% in *Campylobacter* isolati da tacchini.

Anche per il trimethoprim-sulfametossazolo è stata rilevata una resistenza, che in tutti e tre gli allevamenti di tacchini monitorati, era vicina o raggiungeva il 100%. Tale dato è ampiamente in accordo con quanto segnalato in letteratura, che riporta alti livelli di resistenza nei confronti di questa molecola antimicrobica (Pezzotti *et al.*, 2003). In *Campylobacter* la resistenza al trimethoprim è dovuta ai geni *dfr1* e *dfr9* che codificano per una variante di diidrofolato-reduttasi resistente all'azione del sulfamidico (Gibreel e Skold, 1998). Tali geni sono localizzati a livello del cromosoma batterico e sono legati a elementi mobili o possibilmente mobili, quali integroni e trasposoni, suggerendo che *Campylobacter* può acquisire il gene tramite trasferimento di materiale genetico per via orizzontale (Gibreel e Skold, 1998).

In tutti i ceppi di *Campylobacter* testati, è stata rilevata una totale sensibilità alla tiamulina. Anche se i meccanismi di insorgenza della resistenza batterica a questa molecola antimicrobica non sono stati ancora ben definiti, è stata descritta la comparsa di una resistenza cromosomica la cui insorgenza tuttavia appare meno veloce di quella già descritta per i macrolidi (Belloli, 2009). L'utilizzo della tiamulina nell'allevamento avicolo è tuttavia limitata a causa

della sua interazione con i coccidiostatici. La tiamulina presenta un'interazione nel corso dei processi biotrasformativi con gli isoenzimi del citocromo P450, determinando un'inibizione enzimatica (Belloli, 2009). L'associazione di questa molecola antimicrobica con altri farmaci ionofori, provoca in seguito all'inibizione enzimatica, il conseguimento di concentrazioni ematiche di quest'ultimo farmaco fatali per le specie avicole (Belloli, 2009). La totale sensibilità di *Campylobacter* rilevata potrebbe essere quindi dovuta allo scarso, se non nullo, utilizzo della tiamulina quale molecola antimicrobica negli allevamenti da noi monitorati.

Dalla nostra indagine è emerso, dunque, che i livelli di resistenza batterica più elevati si rilevano verso farmaci, il cui utilizzo è maggiormente frequente e diffuso in allevamento. Livelli di resistenza inferiori o piena sensibilità del microrganismo sono, invece, rilevati verso quelle molecole antimicrobiche il cui utilizzo in allevamento è più limitato o non avviene affatto, sottolineando ancora una volta la diretta correlazione tra l'utilizzo della molecola antimicrobica e lo sviluppo della resistenza di *Campylobacter* verso quella determinata molecola. Infine, in accordo con quanto riportato negli Stati Uniti da Gu *et al.* (2009) in *Campylobacter* isolati da allevamenti di tacchino, nella nostra indagine si è rilevato un gran numero di *Campylobacter* resistenti a numerose classi antimicrobiche contemporaneamente, ponendo una particolare luce sulla caratteristica multi-resistenza di questo batterio. Di notevole interesse risulta la presenza di un ceppo di *C. coli* risultato resistente a ben 8 delle 10 classi antimicrobiche testate.

Per concludere, la ricerca degli integroni di classe 1 e di classe 2 ha dato esito negativo. Infatti, in tutti i 234 ceppi isolati nei tre allevamenti di tacchini non è stato rinvenuto il gene che codifica per l'integrasi. La bibliografia in merito risulta alquanto scarsa e i pochi articoli pubblicati presentano dei risultati alquanto contrastanti. O'Halloran *et al.* (2004) hanno rilevato 62 integroni di classe 1 in 378 ceppi di *Campylobacter* testati. Van Essen-Zandberg *et al.* (2007), invece, non hanno rilevato nessun integrone di classe 1 o di classe 2 in

40 ceppi di *Campylobacter* esaminati. Lee *et al.* (2002) hanno rilevato che, su 105 ceppi microbici, il 21% (22) possedeva il gene per l'integrasi, ma di questi solo 5 producevano un amplicone della regione variabile degli integroni. Tali risultati suggeriscono che il trasferimento della farmaco-resistenza tramite queste strutture genetiche mobili non sia diffuso in *Campylobacter*, contrariamente a quanto avviene con altri batteri, come *Escherichia coli* o *Salmonella* (van Essen-Zandbergen *et al.*, 2007). Tuttavia, la scarsa bibliografia internazionale e i rari studi compiuti sulla presenza degli integroni in *Campylobacter*, indirizzano verso una maggiore ricerca nei confronti di tale microorganismo, al fine di ottenere maggiori risultati di comparazione per poter attribuire un più chiaro livello di importanza agli integroni, come veicolo di trasferimento genetico orizzontale in *Campylobacter*.

6. CONCLUSIONI

Campylobacter è un agente zoonosico capace di infettare l'uomo, principalmente attraverso il consumo di carni avicole crude o poco cotte. L'infezione nell'uomo si manifesta prevalentemente attraverso una patologia di tipo enterico, caratterizzata da diarrea con un decorso autolimitante e che spesso non richiede l'utilizzo di farmaci antimicrobici. Non di rado tuttavia, in pazienti pediatrici, geriatrici o immuno-compromessi, l'utilizzo dei farmaci antimicrobici è essenziale. Il problema della farmaco-resistenza dell'agente eziologico in questi casi risulta di vitale interesse. L'insuccesso di una terapia farmacologica può in certi casi avere un esito gravissimo, risultante nella morte del paziente. Da ciò è chiaramente intuibile come la possibilità di contare su validi strumenti di lotta contro il microrganismo assuma un interesse particolarmente rilevante. Nel caso di *Campylobacter* lo sviluppo della resistenza agli antimicrobici può essere ricondotto a due principali fenomeni: la grande instabilità genomica del batterio e l'utilizzo irrazionale delle molecole antimicrobiche. L'instabilità genomica di *Campylobacter* è dovuta a riarrangiamenti intergenici e trasformazioni naturali, che possono verificarsi a livello di singoli *loci* o a livello dell'intero genoma. La pressione selettiva, invece, indotta dall'utilizzo di molecole antimicrobiche, soprattutto a concentrazioni sub-terapeutiche, trova magnificazione in questo tipo di batterio, capace di adattarsi, spesso in tempi rapidissimi, a un ambiente divenuto appunto più selettivo. Il batterio resistente, selezionato in allevamento, può quindi facilmente raggiungere attraverso la catena alimentare il sistema gastro-enterico dell'uomo, sfruttando i probabili punti critici e le possibili debolezze in materia di igiene delle produzioni alimentari.

Nell'allevamento dei tacchini da carne, tuttavia, i vari studi compiuti sia a livello nazionale, sia a livello internazionale, sono ancora molto scarsi. Manca una delineata e precisa idea sull'andamento della farmaco-resistenza del batterio, che colonizza questi animali. Si ritiene, quindi, opportuna un'attività di

monitoraggio continua, non solo per determinare la presenza e l'antibiotico-resistenza del batterio negli allevamenti, ma anche per sensibilizzare i produttori a un utilizzo più razionale del farmaco, ricordando come il microrganismo resistente possa facilmente raggiungere il consumatore, rappresentando quindi un serio problema in materia di Sanità Pubblica.

7. BIBLIOGRAFIA

1. Aarestrup F.M., Nielsen E.M., Madsen M., Enberg J. 1997. Antimicrobial susceptibility patterns of thermophilic *Campylobacter* spp. from humans, pigs, cattle and broilers in Denmark. *Antimicrob Agents Chemother*, 41: 2244-2250
2. Acuff G.R., Vanderzant C., Hanna M.O., Ehlers J.G., Golan F.A., Gardner F.A. 1986. Prevalence of *Campylobacter jejuni* in turkey carcass processing and further processing of turkey product. *J Food Protect*, 49: 712-717
3. Acik M.N., Cetinkaya B. 2006. Heterogeneity of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* strains from healthy sheep. *Vet Microbiol*. 115: 370-375
4. Alfredson D.A., Korolik V. 2007. Antibiotic resistance mechanisms in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *FEMS Microbiol Lett*. 277: 123-132
5. Allen V.M., Bull S.A., Corry J.E., Domingue G., Jorgensen F., Frost J.A., Whyte R., Gonzalez A., Elviss N., Humphrey T.J. 2007. *Campylobacter* spp. contamination of chicken carcasses during processing in relation to flock colonisation. *Int J Food Microbiol*. 113: 54-61
6. Arsenault J., Letellier A., Quessy S., Normand V., Boulianne M. 2007. Prevalence and risk factors for *Salmonella* spp. and *Campylobacter* spp. caecal colonization in broiler chicken and turkey flocks slaughtered in Quebec, Canada. *Prev Vet Med*. 81: 250-64
7. Arun K.B. 2008 In: *Foodborne Microbial Pathogens: mechanisms and pathogenesis of Campylobacter and Arcobacter*, pp 217-226. Springer Publisher, New York.

8. Atanassova V., Reich F., Beckmann L., Klein G. 2007. Prevalence of *Campylobacter spp.* in turkey meat from a slaughterhouse and in turkey meat retail products. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 49: 141-145

9. Avrai L., Humbert F., L'Hospitalier R., Sanders P., Vernozy-Rozand C., Kempf I. 2003. Antimicrobial resistance in *Campylobacter* from broilers: association with production type and antimicrobial use. *Veterinary Microbiol.* 96: 267-276

10. Bae W., Kaya K.N., Hancock D.D., Call D.R., Park Y.H., Besser T.E. 2005. Prevalence and antimicrobial resistance of thermophilic *Campylobacter spp.* from cattle farms in Washington State. *Appl Environ Microbiol*; 71: 169-74

11. Bardon J., Kolar M., Cekanova L., Hejnar P., Koukalova D. 2008. Prevalence of *Campylobacter jejuni* and its resistance to antibiotics in poultry in the Czech Republic. *Zoonoses and Public Health.*; 56: 111-116

12. Bates C., Hiatt K.L., Stern N.J. 2004. Relationship of *Campylobacter* isolated from poultry and from darkling beetles in New Zealand. *Avian Dis*; 48: 138-47

13. Bauer A.W., Kirby W.M.M., Sherris J.C., Turck M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Tech Bull Regist Med Technol.*; 36: 493-496

14. Beery J.T, Hugdahl M.B, Doyle M.P. 1988. Colonization of gastrointestinal tracts of chicks by *Campylobacter jejuni*. *Appl Environ Microbiol.* 54: 2365-2370

15. Belloli C. 2009. Macrolidi, lincosamidi e streptogamine. Pleromutiline. Fenicolati. Rifampicine. In: Carli S., Ormas P. , Re G., Soldani G. (Eds), *Farmacologia veterinaria*, 1a Ed, pp 749-770. Idelson- Gnocchi srl

16. Bennett P.M. 1999. Integrins and gene cassettes: a genetic construction kit for bacteria. *J Antimicrob Chemother.* 43: 1-4

17. Blaser M.J., Taylor D.N., Feldam R.A. 1984. Epidemiology of *Campylobacter* infections. In: Butzler J.P. (Eds), *Campylobacter Infection in Man and Animals*, pp 143-161. CRC Press Boca Raton, FL.
18. Buhr R.J., Musgrove M.T., Richardson L.J., Cox N.A., Wilson J.L., Bailey J.S., Cosby D.E., Bourassa D.V. 2005. Recovery of *Campylobacter jejuni* in feces and semen of caged broiler breeder roosters following three route of inoculation. *Avian Dis.* 49: 577-81
19. Byrne C.M., Clyne M., Bourke B. 2007. *Campylobacter jejuni* adhere to and invade chicken intestinal epithelial cells in vitro. *Microbiol.* 153: 561-569
20. Cagliero C., Mouline C., Cloeckert A., Payot S. 2006. Synergy between efflux pump *CmeABC* and modifications in ribosomal protein L4 and L22 in conferring macrolide resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* 50: 3893-96
21. Cagliero C., Mouline C., Cloeckert A., Payot S. 2005. Involvement of the *CmeABC* efflux pump in the macrolide resistance of *Campylobacter coli*. *J Antimicrob Chemother.* 56: 948-950
22. Carattoli A. importance of integrons in the diffusion of resistance. 2001. *Vet Res.* 32: 243-259
23. CDC. 2005. *Campylobacter* infection. Atalanta, GA: Departement of health and Human Service, Centre for Disease Control, Division of Bacterial and Mycotic Disease.
24. CIPARS. 2005. Canadian Integrated Program for Antimicrobial Resistance Surveillance (CIPARS).
25. Cocker A.O., Isokpehi R.D., Thomas B.N., Amisu K.O., Obi C.L. 2002. Human campylobacteriosis in developing countries. *Emerg Infect Dis.* 8: 237-243

26. Connell S.R., Traez D.M., Taylor D.E., Nierhaus K.H. 2003. Ribosomal protection proteins and their mechanism of tetracycline resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 47: 3675-3681
27. Cook A., Reid-Smith R., Irwin R., McEwen S.A., Valdivieso-Garcia A., Ribble C. 2009. Antimicrobial resistance in *Campylobacter*, *Salmonella*, and *Escherichia coli* isolated from retail turkey meat from southern Ontario, Canada. *J Food Protec.* 72: 473-481
28. Cox N.A., Bailey J.S., Richardson L.J., Buhr R.J., Cosby D.E., Wilson J.L., Hiatt K.L., Siragusa G.R., Bourassa D.V. 2005. Presence of naturally occurring *Campylobacter* and *Salmonella* in the mature and immature ovarian follicles of late-life broiler breeder hens. *Avian Dis.* 49: 285-287
29. Damborg P., Olsen K.E.P., Nielson E.M., Guardabassi L. 2004. Occurrence of *Campylobacter jejuni* in pets living with human patients infected with *C. jejuni*. *J Clin Microbiol.* 42: 1363-1364
30. Davidson D.J. 2004. In the matter of enrofloxacin for poultry: withdrawal of approval of Bayer Corporation's new animal drug application (NADA) 140-828 (Baytril). *FDA Docket no. 00N-1571*
31. Desmots M.H., Dufour-Gesbert F., Avrain L., Kempf I. 2004. Antimicrobial resistance in *Campylobacter* strains isolated from French broilers before and after antimicrobial growth promoters bans. *J Antimicro Chemother.* 54: 1025-1030
32. D'lima C.B., Miller W.G., Mandrell R.E., Wright S.L., Siletsky R.M., Carver D.K., Kathariou S. 2007. Clonal population structure and specific genotypes of multidrug-resistance *Campylobacter coli* from turkeys. *Appl Environ Microbiol.* 73: 2156-2164
33. Dhillon A.S., Shuvaprasad H.L., Schaberg D., Wier F., Weber S., Bandli D. 2006. *Campylobacter jejuni* infection in broiler chickens. *Avian Dis.* 50: 55-58

34. Doorduyn Y., Van Pelt W., Siezen C.L., Van Der Horst F., Van Duynhoven Y.T., Hoebee B., Janssen R. 2008. Novel insight in the association between salmonellosis or campylobacteriosis and chronic illness, and the role of host genetics in susceptibility to these disease. *Epidemiol Infect.* 136: 1225-1234
35. Doyle M.P., Roman D.J. 1982. Prevalence and survival of *Campylobacter jejuni* in unpasteurized milk. *Appl Environ Microbiol.* 44: 1154-1158
36. Doyle M.P. 1984. Association of *Campylobacter jejuni* with laying hens and eggs. *Appl Environ Microbiol.* 47: 533-536
37. EFSA. 2011. Scientific report of EFSA and ECDC. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2009. *EFSA J.* 9: 2090-2468
38. EFSA. 2011. Scientific report of EFSA and ECDC. The European Union Summary Report on antimicrobial resistance and indicator bacteria from humans, animals and food in the European Union in 2009. *EFSA J.* 9: 2154-2475
39. EFSA. 2009. Joint opinion on antimicrobial resistance (AMR) focused on zoonotic infections. Scientific opinion of the European Centre for Disease Prevention and Control; Scientific opinion of the panel on biological hazards; Opinion of the Committee for medicinal products for veterinary use; Scientific opinion of the scientific committee on emerging and newly identified health risks. *EFSA J.* 7: 1372-1450
40. EFSA. 2006. The community summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotics agents, antimicrobial resistance and foodborne outbreaks in the European Union in 2005. *EFSA J.* 94: 84-288
41. Ekkapobytin C., Padungtod P., Chuanchuen R. 2008. Antimicrobial resistance of *Campylobacter coli* isolated from swine. *Int J Food Microbiol.* 128: 325-328

42. Fluit A.C., Schmitz F.J. 1999. Class 1 integrons, gene cassettes, mobility and epidemiology. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*.18: 761-770
43. Franco D.A., Williams C.E. 2001. *Campylobacter jejuni*. In: Huy H.J., Pierson M.D., Gorham J.R. (Eds), *Foodborne disease handbook* 2nd Ed, pp 83-105. Marcel Dekker Inc, New York
44. Friedman C., Neimann J., Wegener H., Tauxe R. 2008. Epidemiology of *Campylobacter jejuni* infections in the United States and other industrialized nations. In: Nachamkin I., Szymanski C.M., Blaser M.J. (Eds), *Campylobacter*, 4th Ed, pp. 645-665. ASM Press, Washington, DC.
45. Gallay A., Prouzet-Mauleon V., Kempf I., Lehours P., Labado L., Camou C., Denis M., de Valk H., Desenclos J.C., Megraud F. 2007. *Campylobacter* antimicrobial drug resistance among humans, broiler, chicken and pig, France. *Emerg Infect Dis*.13: 259-266
46. Ge B., McDermott P.F., White D.G., Meng J. 2005. Role of efflux pumps and topoisomerase mutations in fluoroquinolone resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Antimicrob Agents Chemother*. 49: 3347-3354
47. Gibreel A., Taylor D.E. 2006. Macolide resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *J Antimicrob Chemother*. 58: 243-255
48. Gibreel A., Skold O. 1998. High level resistance to trimethoprim in clinical isolates of *Campylobacter jejuni* by acquisition of foreign genes (*dfr1* and *dfr9*) expressing drug-insensitive dihydrofolate reductases. *Antimicrob Agents Chemother*. 42: 3059-3064
49. Gillespie I.A., O'Brien S.J., Frost J.A., Adak G.K., Horby P., Swan A.V., Painter M.J., Neal K.R. 2002. A case-case comparison of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* infection: a tool for generating hypotheses. *Campylobacter* sentinel surveillance scheme collaborators. *Emerg Infect Dis*. 8: 937-942

50. Gu W., Siltzky R.M., Wright S., Islam M., Kathariu S. 2009. Antimicrobial susceptibility profiles and strain type diversity of *Campylobacter jejuni* isolates from turkeys in eastern North Carolina. *Appl Environ Microbiol.* 75: 474-482
51. Guerin M.T., Sir C., Sargeant J.M., Waddell L., O'Connor A.M., Wills R.W., Bailey R.H., Byrd J.A. 2010. The change in prevalence of *Campylobacter* on chicken carcasses during processing: a systematic review. *Poult Sci.* 89: 1070-1084
52. Gupta A., Nelson J.M., Barret T.J., Tauxe R.V., Rossiter S.P., Friedman C.R., Joyce K.W., Smith K.E., Jones T.F., Hawkins M.A., Shiferaw B., Beebe J.L., Vugia D.J., Rabatcky-Her T., Benson J.A., Root T.P., Angulo F.J. 2004 NARMS working group. *Emerg Infect Dis.* 10: 1102-1109
53. Gyles C.L. 2008. Antimicrobial resistance in selected bacteria from poultry. *Anim Health Res Rev.* 9: 149-158
54. Hald B., Skovgard H., Bang D.D., Pedersen K., Dybdahl J., Jespersen J.B., Madsen M. 2004. Flies and *Campylobacter* infection of broiler flocks. *Emerg Infect Dis.* 10: 1490-1492
55. Hald B., Pedersen K., Waino M., Jorgebsen J.C., Madsen M. 2004. Longitudinal study of the excretion patterns of thermophilic *Campylobacter* spp. in young pet dogs in Denmark. *J Clin Microbiol.* 42: 2003-2012
56. Hald B., Sommer H.M., Skovgard H. 2007. Use of fly screens to reduce *Campylobacter* spp. introduction in broiler houses. *Emerg Infect Dis.* 13: 1951-1953
57. Hall R.M., Collins C.M. 1995. Mobile gene cassettes and integrons: capture and spread of genes by site-specific recombination. *Molecular Microbiol.* 15: 593-600

58. Hayama Y., Yamamoto T., Kasuga F., Tsutsui T. 2011. Simulation model for *Campylobacter* cross-contamination during poultry processing at slaughterhouses. *Zoonoses Public Health*. 58: 399-406
59. Helms M., Simonsen J., Molbak K. 2006. Foodborne bacterial infection and hospitalization: a registry-based study. *Clin Infect Dis*. 42: 498-506
60. Herman L., Heyndrickx M., Grijspeerdt K., Vandekerchove D., Rollier I., De Zutter L. 2003. Routes for *Campylobacter* contamination of poultry meat: epidemiological study from hatchery slaughterhouse. *Epidemiol Infect*. 131: 1169-1180
61. Hees B.C., Veldman-Ariesen M.J., de Jongh B.M., Tersmette M., van Pelt W. 2007. Regional and seasonal differences in incidence and antibiotic resistance of *Campylobacter* from a nationwide surveillance study in The Netherlands. *Clin Microbiol Infect*. 13: 305-310
62. Horrocks S.M., Anderson R.C., Nisbet D.J., Ricke S.C. 2009. Incidence and ecology of *Campylobacter jejuni* and *coli* in animals. *Food Microbiol*. 15: 18-25
63. Jana S., Deb J.K. 2006. Molecular understanding of aminoglycoside action and resistance. *Appl Microbiol Biotechnol*. 70: 140-150
64. Ladely S.R., Harrison M.A., Fedorka-Cray P.J., Berrang M.E., Englen M.D., Meinersmann R.J. 2007. Development of macrolide-resistant *Campylobacter* in broiler administered subtherapeutic or therapeutic concentration of tylosin. *J Food Protec*. 70: 1945-1951
65. Lamhonwah A., Ackerley C., Onizuka R., Tiups A., Lamhonwah D., Chung C. et al. 2005. Epitope shared by functional variant of organic cation/carnitine transporter, OCTN1, *Campylobacter jejuni* and *Mycobacterium paratuberculosis* may underlie susceptibility to Crohn's disease at 5q31. *Biochem Biophys Res Commun*. 337: 1165-1175

66. Larkin C., Van Donkersgoed C., Mahdi A., Johnson P., McNab B., Ondumeru J. 2006. Antibiotic resistance of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from hog, beef and chicken carcass samples from provincially inspected abattoirs in Ontario. *J Food Protec.* 69: 22-26
67. Lee B., Reimers N., Barnes H.J., D'Lima C., Carver D., Kathariou S. 2005. Strain persistence and fluctuation of multiple-antibiotic resistant *Campylobacter coli* colonizing turkeys over successive production cycles. *Foodborne Pathog Dis.* 2: 103-110
68. Lee M.D., Sanchez S., Zimmer M., Idris U., Berrang M.E., McDermott P.F. 2002. Class 1 integron-associated tobramycin-gentamicin resistance in *Campylobacter jejuni* isolated from the broiler chicken house environment. *Antimicrob Agents Chemother.* 46: 3660-3664
69. Leclercq R. 2002. Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: nature of resistance elements and their clinical implications. *Clin Infect Dis.* 34: 482-492
70. Li X. Z., Mehrotra M., Ghimire S., Adewoye L. 2007. Beta-lactam resistance and beta-lactamases in bacteria of animal origin. *Vet Microbiol.* 121: 197-214
71. Lin J., Micheal L.O., Zhang Q. 2002. Cme ABC functions as a multidrug efflux systems in *Campylobacter jejuni*. *Antimicrob Agents Chemother.* 46: 2124-2131
72. Lin J., Yan M., Sahin O., Pereira S., Chang Y. J., Zhang Q. 2007. Effects of macrolide usage on emergence of erythromycin resistant *Campylobacter* isolates in chickens. *Antimicrob Agents Chemother.* 51: 1678-1686
73. Logue C.M., Danzeisen G.T., Sherwood J.S., Thorsness J.L., Mercier B.M., Axtman J.E. 2010. Repeated therapeutic dosing selects macrolide-resistant *Campylobacter spp.* in a turkey facility. *J Appl Microbiol.* 109: 1379-1388

74. Logue S.M., Sherwood J.S., Elijah L.M., Dockter M.R., Dockter O. 2003. The incidence of *Campylobacter* spp. on processed turkey from processing plants in the midwestern United States. *J Appl Microbiol.* 95: 234-241
75. Luangtongkum T., Byeonghawa J., Han J., Plummer P., Logue C.M., Zhang Q. 2009. Antibiotic resistance in *Campylobacter*, transmission and persistence. *Future Microbiol.* 4: 189-200
76. Lungtongkum T., Moroshita T., Ison A.J., Shiuxiong H., McDermott P., Zhang Q. 2006. Effect of conventional and organic production practices on the prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter* spp. in poultry. *Appl Envirom Microbiol.* 72: 3600-3607
77. Luo N., Sahin O., Lin J., Micheal L.O., Zhang Q. 2003. In vivo selection of *Campylobacter* isolates with high levels of fluoroquinolone resistance associated with *gyrA* mutations and the function of the *CmeABC* efflux pump. *Antimicrob Agents Chemother.* 47: 390-394
78. Maguire A.J., Brown D.F.J., Gray J.J., et al. 2001. Rapid screening technique for class 1 integrons in *Enterobacteriaceae* and non fermenting Gram-negative bacteria and its use in molecular epidemiology. *J Antimicrob Chemother.* 45: 1022-1029
79. Mamelli L., Prouzet-Mauleon V., Pages J.M., Megraud F., Bollo J.M. 2005. Molecular basis of macrolide resistance in *Campylobacter*. role of efflux pumps and target mutations. *J Antimicrob Chemother.* 56: 491-497
80. Manavathu E.K., Hiratsuka K., Taylor D.E. 1988. Nucleotide sequence analysis and expression of tetracycline resistance gene from *Campylobacter jejuni*. *Gene.* 62: 17-26
81. Mazel D. 2006. Integrons: agents of bacterial evolution. *Nat Rev Microbiol.* 4: 605-620

82. Miflin J.K., Templeton J.M., Blackall P.J. 2007. Antibiotic resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from poultry in the South-East Queensland region. *J Antimicrob Chemother.* 59: 775-778
83. Murray P.R., Rosenthal K.S., Pfaller M.A. 2008. *Campylobacter* ed *Helicobacter*. In: *Microbiologia medica*, 5a Ed italiana, pp 355-363. EMSI, Roma
84. Nachamkin I. et al. 1998. *Campylobacter* spp. and Guillain-Barré syndrome. *Clin Microbiol Rev.* 11: 555-567
85. Nachamkin I., Ung H., Li M. 2002. Increased fluoroquinolone resistance in *Campylobacter jejuni*, Pennsylvania, USA, 1982-2001. *Emerg Infect Dis.* 8: 1501-1503
86. NARMS. 2006. NARMS Retail Meat Annual Report. National Antimicrobial Resistance Monitoring System.
87. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2004. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 14th informational supplement. M100-S14, vol 24, no. 1. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA
88. Newell D.G., Fearnley C. 2003. Sources of *Campylobacter* colonization in broiler chickens. *Appl Environ Microbiol.* 69: 4343-4351
89. O'Halloran F., Lucey B., Cryan B., Buckley T., Fanning S. 2004. Molecular characterization of class 1 integrons from Irish thermophilic *Campylobacter* spp. *J Antimicrob Chemother.* 53: 952-957
90. Payot S., Avrain L., Magras C., Praud A., Cloeckaert A., Chaslus-Duncla. 2004. Relative contribution of target gene mutations and efflux to fluoroquinolone and erythromycin resistance, in French poultry and pig isolates of *Campylobacter coli*. *Int J Antimicrob Agents.* 23: 468-472

91. Payot S., Bolla J.M., Corcoran D., Fanning F., Megraud F, Zhang Q. 2006. Mechanism of fluoroquinolone and macrolide resistance in *Campylobacter* spp. *Microbes Infect.* 8: 1967-1971
92. Penner J.L. 1988. The genus *Campylobacter*: a decade of progress. *Clin Microbiol Rev.* 1: 157-172
93. Perko-Makela P., Isohanni P., Katzav M., Lund M., Hanninen M.L., Lyhs U. 2009. A longitudinal study of *Campylobacter* distribution in turkey production chain. *Acta Vet Scand.* 51: 18-28
94. Pezzotti G., Serafin A., Luzzi I., Mioni R., Milan M., Perin R. 2003. Occurrence and resistance to antibiotics of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in animals and meat in northeastern Italy. *International J Food Microbiol.* 82: 281-287
95. Ramirez M.S., Vargas L.J., Cagnoni V., Tojikumoto M., Centron D. 2005. Class 2 integron with a novel cassette array in a *Burkholderia cenocepacia* isolate. *Antimicrob Agents Chemother.* 49: 4418-4420
96. Recchia G.D, Hall R.M. 1995. Gene cassettes: a new class of mobile element. *Microbiol.* 141: 3015-3027
97. Regolamento CE n. 1430/94 della Commissione del 22 Giugno 1994. *Gazzetta Ufficiale delle Comunità Europee*
98. Rosef O., Rettedal G., Lageide L. 2001. Thermophilic *Campylobacters* in surface water: a potential risk of *Campylobacter*. *Int J Environ Health Res.* 11: 321-327
99. Rosenquist H., Sommer H.M., Nielsen N.L., Christensen B.B. 2006. The effect of slaughter operations on the contamination of chicken carcasses with thermotolerant *Campylobacter*. *Int J Food Microbiol.* 108: 226-232

100. Saenz Y., Zarazaga M., Lantero M., Gastanares M.J., Baquero F., Torres C. 2000. Antibiotics resistance in *Campylobacter* strains isolated from animals, foods, and humans in Spain in 1997-1998. *Antimicrob Agents Chemother.* 44: 267-271
101. Sahin O., Luo N., Huang S., Zhang Q. 2003. Effect of *Campylobacter*-specific maternal antibodies on *Campylobacter jejuni* colonization in young chickens. *Appl Environ Microbiol.* 69: 5372-5379
102. Schlunzen F., Zarivach R., Harms J., Bashan A., Tocilj A., Albrecht R., Yonath A., Franceschi F. 2001. Structural basis for the interaction of antibiotics with the peptidyl-transferase centre in eubacteria. *Nature.* 413: 814-821
103. Shane S.M., Montrose M.S. 1985. The occurrence and significance of *Campylobacter jejuni* in man and animals. *Vet Res Commun.* 9: 167-198
104. Skirrow M.B., Blaser M.J. 2000. Clinical aspects of *Campylobacter* infection. In: Nachamkin I., Blaser M.J. (Eds), *Campylobacter*, 2nd Ed, pp. 69-88. ASM Press, Whashington DC.
105. Smith K., Reimers N., Barnes H.J., Lee B.C., Siletzky R., Kathariou S. 2004. *Campylobacter* colonization of sibling turkey flocks reared under different management conditions. *J Food Prot.* 67: 1463-1468
106. Son I., Englen M.D., Berrang M.E., Fedorka-Cray P.J., Harrison M.A. Antimicrobial resistance of *Arcobacter* and *Campylobacter* from broiler carcasses. *Int J of Antimicrob Agents.* 29: 451-455
107. Sougakoff W., Papadopoulou B., Nordmann P., Courvalin P. 1987. Nucleotide-sequence and distribution of gene *tet(O)* encoding tetracycline resistance in *Campylobacter coli*. *FEMS Microbiol Lett.* 44: 153-159

108. Stern N.J., Cox N.A., Bailey J.S., Berrang M.E., Musgrove M.T. 2001. Comparison of mucosal competitive exclusion and competitive exclusion treatment to reduce *Salmonella* and *Campylobacter* spp. colonization in broiler chickens. *Poult Sci.* 80: 156-160
109. Stern N.J., Cox N.A., Musgrove M.T. 2001. Incidence and levels of *Campylobacter* in broilers after exposure to an inoculated seeder bird. *J Appl Res.* 10: 315-318
110. Takahashi T., Ishihara K., Kojima A., Asai T., Harada K., Tamura Y. Emergence of fluoroquinolone resistance in *Campylobacter jejuni* in chickens exposed to enrofloxacin treatment at the inherent dosage licensed in Japan. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health.* 52: 460-464
111. Taylor D.E., Keelan M. 2006. *Campylobacter* and *Arcobacter* spp. In: Gillespie S.H., Hawkey P.M. (Eds), *Principle and practice of clinical bacteriology*, 2nd Ed, pp 485-502. John Wiley & Sons Ltd
112. Taylor D.E., Tracz D.M. 2005. mechanisms of antimicrobial resistance in *Campylobacter*. In: Ketley J.M., Konkel M.E. (Eds), *Campylobacter: Molecular Cellular Biology*, pp193-204. Horizon Bioscience, Norfolk, United Kingdom
113. Taylor D.E., Hiratsuka K., Ray H., Manavathu E.K. 1987. Characterization and expression of a cloned tetracycline resistance determinant from *Campylobacter jejuni* plasmid pUA466. *J Bacteriol.* 169: 2984-2989
114. Thakur S., Gebreyes W.A. 2005. Prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter* in antimicrobial-free and conventional pig production systems. *J Food Prot.* 68: 2402-2410
115. Van der Wielen P.W.J.J., Biesterveld S., Notermans S., Hofstra H., Urlings B.A.P., Van Knapen F. 2000. Role of volatile fatty acid in development of the cecal microflora in broiler chickens during growth. *Appl Environ Microbiol.* 66: 2536-2540

116. Van Essen-Zandberg A., Smith H., Kees V., Mevius D. 2007. Occurrence and characteristics of class 1, 2 and 3 integrons in *Escherichia coli*, *Salmonella* and *Campylobacter* spp. in the Netherlands. *J Antimicrob Chemother.* 59: 746-750
117. Wempe J.M, Genigeorgis C.A., Farver T.B., Yusufu H.L. 1983. Prevalence of *Campylobacter jejuni* in two California chicken processing plants. *Appl Environ Microbil.* 45: 355-359
118. Willis W.L., Murray C. 1997. *Campylobacter jejuni* seasonal recovery observations of retail market broilers. *Poult Sci.* 76: 314-317
119. Zhang Q., Plummer P. 2008. Mechanisms of antibiotic resistance in *Campylobacter*. In : Nachamkin I., Szymansky C.M., Blaser M.J. (Eds). *Campylobacter*, 4th Ed, pp 263-272. ASM Press; Washington DC, USA.
120. Zhang Q., Lin J., Pereira S. 2003. Fluoroquinolone-resistant *Campylobacter* in animal reservoir: dynamics of development, resistance mechanisms and ecological fitness. *Anim Health Res Rev.* 4: 63-71
121. Zhao S., Young S.R., Tong E., Abbott J.W., Womack N., Friedman S.L., McDemmott P.F. 2010. Antimicrobial resistance of *Campylobacter* isolates from retail meat in the United States between 2002 and 2007. *Appl and Environmental Microbiol.* 76: 7949-7956

Ringraziamenti

Un grazie sincero ai docenti, ricercatori, dottorandi e tecnici del dipartimento di Sanità Pubblica, Patologia Comparata e Igiene Veterinaria, per l'immane cortesia, gentilezza e pazienza dimostratami durante più di due anni di lavoro.

Grazie alla dottoressa Piccirillo per avermi dato l'opportunità e la possibilità di fare della Microbiologia un orizzonte concreto.

Grazie a Martina e Giorgia, impareggiabili insegnanti, angeli custodi e fidate dispensatrici di consigli e rassicurazioni.

Grazie a tutti i miei cari amici che nelle lunghe serate di conversazione fingevano amabilmente di interessarsi ai *Campylobacter* termofili e agli integrali di classe 1 e 2.

Grazie a tutte le persone a me care che mi hanno sopportato e supportato durante la stesura di questo lavoro di Tesi.