



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

CORSO DI LAUREA SPECIALISTICA IN MEDICINA VETERINARIA A
CICLO UNICO

TESI DI LAUREA

Indagine sulla presenza e l'antibiotico-resistenza di *Campylobacter* spp. in cani e gatti del Veneto

Relatore: Dr.ssa Alessandra Piccirillo
Dipartimento di Biomedicina Comparata e Alimentazione

Correlatore: Dr.ssa Martina Giacomelli
Dipartimento di Biomedicina Comparata e Alimentazione

Correlatore: Dr. Luigi Michele Coppola
Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute

Laureando: Niccolò Follador
Matricola: 525306

Anno accademico: 2012-2013

Sommario

Capitolo 1 - Premessa	1
Capitolo 2 - Introduzione.....	3
2.1 Caratteristiche generali di <i>Campylobacter</i>	3
2.2 Aspetti zoonotici delle infezioni da <i>Campylobacter</i>	7
2.2.1 Diffusione dell'infezione da <i>Campylobacter</i> nell'uomo	9
2.2.2. Campilobatteriosi: nozioni generali.....	13
2.2.3 Trasmissione di <i>Campylobacter</i> all'uomo.....	15
2.2.3.1 Fonti alimentari di casi sporadici di campilobatteriosi.....	16
2.2.3.2 Fonti alimentari di epidemie di campilobatteriosi	20
2.3 <i>Campylobacter</i> negli Animali.....	21
2.4 <i>Campylobacter</i> nel cane e nel gatto	22
2.5 Resistenza agli antimicrobici di <i>Campylobacter</i>	27
2.5.1 Antibiotico-resistenza in cane e gatto	29
Capitolo 3 - Scopo del lavoro.....	31
Capitolo 4 - Materiali e Metodi	33
4.1 Campionamento	33
4.2 Isolamento e identificazione di <i>Campylobacter</i> spp.	35
4.2.1 Isolamento.....	35
4.2.2 Identificazione	38
4.3 Valutazione della sensibilità agli antimicrobici.....	40
4.4 Analisi statistica dei dati	44
Capitolo 5 - Risultati	45
5.1 <i>Campylobacter</i> spp. nei cani.....	45
5.1.1 Presenza di <i>Campylobacter</i> spp. nei cani in relazione al sesso	46
5.1.2 Presenza di <i>Campylobacter</i> spp. nei cani in relazione all'età.....	46
5.1.3 Presenza di <i>Campylobacter</i> spp. nei cani in relazione alla loro origine	47
5.1.4 Presenza di <i>Campylobacter</i> spp. nei cani in relazione alla stagione di campionamento	48
5.1.5 Presenza di <i>Campylobacter</i> spp. nei cani in relazione a sintomatologia diarroica	49
5.2 <i>Campylobacter</i> spp. nei gatti.....	50
5.2.1 Presenza di <i>Campylobacter</i> spp. nei gatti in relazione al sesso	50
5.2.2 Presenza di <i>Campylobacter</i> spp. nei gatti in relazione all'età.....	51

5.2.3 Presenza di <i>Campylobacter</i> spp. nei gatti in relazione alla loro origine.....	52
5.2.4 Presenza di <i>Campylobacter</i> spp. nei gatti in relazione alla stagione di campionamento	53
5.2.5 Presenza di <i>Campylobacter</i> spp. nei gatti in relazione a sintomatologia diarroica.....	53
5.3 Esito dell'analisi statistica	54
5.4 Resistenza agli antimicrobici	54
5.4.1 Valutazione della multi-resistenza	60
Capitolo 6 - Discussione.....	61
6.1 Presenza di <i>Campylobacter</i> spp. in cane e gatto.....	61
6.2 Antibiotico-resistenza di <i>Campylobacter</i> spp. in cane e gatto	68
Capitolo 7 - Conclusione	73
Bibliografia.....	77
Webgrafia	83

Capitolo 1 - Premessa

Nei miei anni di studi presso la Facoltà di Medicina Veterinaria dell'Università di Padova ho spesso sentito parlare di *Campylobacter* e delle patologie da esso provocate. I corsi che maggiormente hanno affrontato l'argomento sono stati quelli basati sull'igiene degli alimenti, sulla patologia e anatomia patologica, sull'ostetricia e sulla patologia aviaria. Sebbene quindi *Campylobacter* fosse stato trattato in molte materie, la sua presenza in animali come cane e gatto era stata accennata solo in alcune di queste. Per tale motivo sono rimasto molto sorpreso quando, dopo aver fatto richiesta di tesi presso l'area di Microbiologia e Malattie Infettive, mi fu proposta una tesi su questo argomento. Il lavoro da svolgere ha da subito stimolato la mia curiosità, soprattutto in virtù del fatto che le ricerche effettuate su *Campylobacter* nel cane e nel gatto sono poche e i dati raccolti ancora piuttosto discordanti. Ho quindi affrontato la tesi con entusiasmo e, devo ammettere, grazie allo svolgimento della parte pratica ho potuto apprezzare molti aspetti della vita lavorativa sia in una clinica veterinaria, sia in un laboratorio di batteriologia e imparare molto in tutti e due i campi.

Capitolo 2 - Introduzione

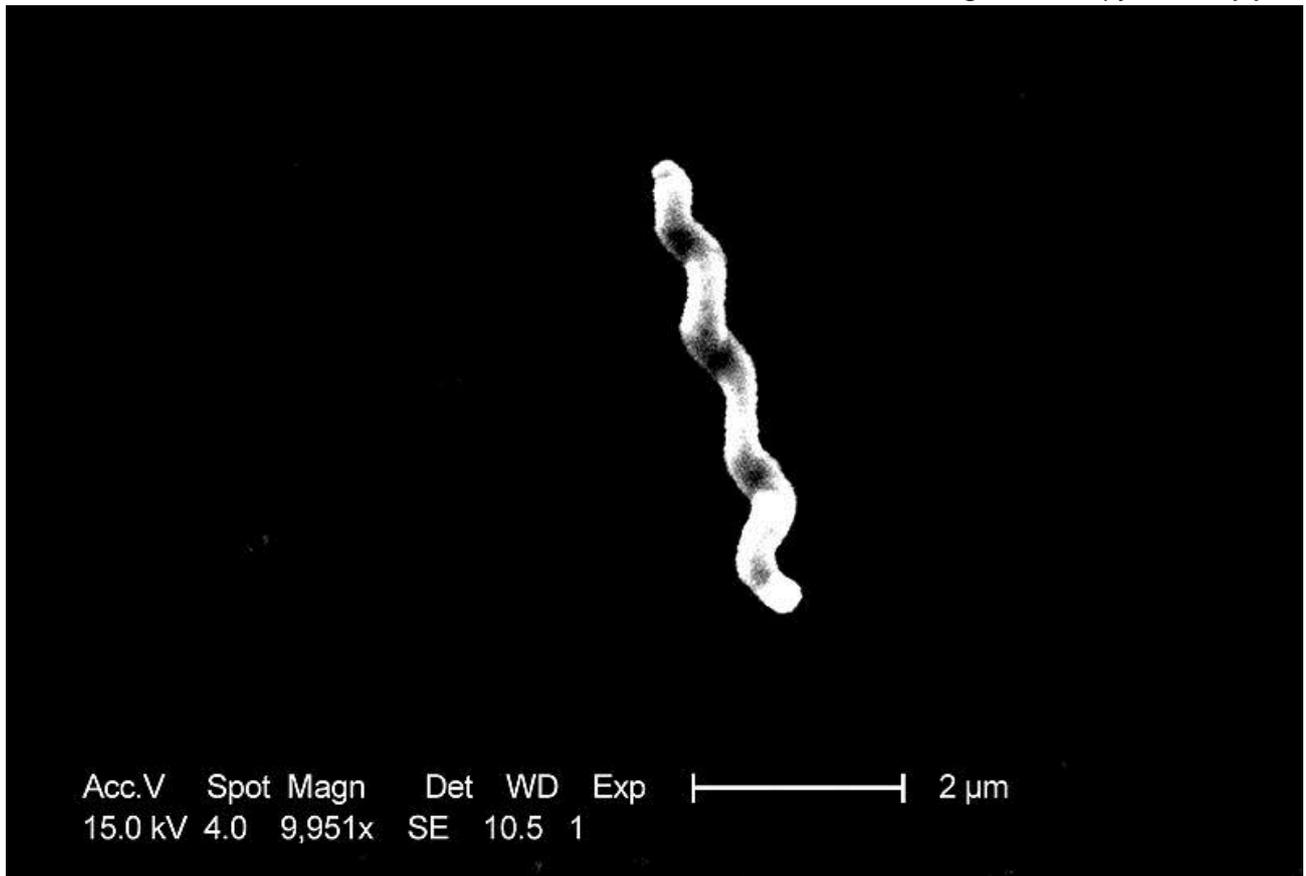
2.1 Caratteristiche generali di *Campylobacter*

La scoperta di *Campylobacter* è un avvenimento abbastanza recente, poiché verificatosi all'incirca intorno alla metà del 1900. Nei decenni precedenti al Novecento *Campylobacter* non era ancora conosciuto, ma già nel 1886 Theodor Escherich descrisse i sintomi della campilobatteriosi negli infanti, definendo tali infezioni “*cholera infantum*” [Vandamme e De Ley 1991]. Successivamente, nel 1913 McFadyen e Stockman identificarono per la prima volta il ruolo di *Campylobacter* come agente abortigeno negli ovini, nel 1918 Smith isolò organismi simili da feti abortiti di bovina e nel 1957 Elizabeth King associò tali patogeni a problemi enterici nell'uomo [King, 1957]. In quegli anni però questi microrganismi furono erroneamente assegnati al genere *Vibrio* a causa del loro aspetto a spirale [Sellu, 1986], finché si scoprì che tali batteri presentavano un metabolismo e un corredo genetico differenti da *Vibrio* e nel 1963 venne creato il genere *Campylobacter* [Sebald e Veron, 1963]. Tuttavia l'isolamento di *Campylobacter* avvenne solo nel 1972, grazie al miglioramento delle tecniche di coltura: in quell'anno Dekeyser e Butzler isolano in purezza il batterio usando un procedimento di filtrazione di feci animali attraverso membrane con pori di 0,64 µm di diametro [Moore e Matsuda, 2002]. Successivamente, nel 1977 Martin Skirrow migliorò ulteriormente il metodo di coltura introducendo terreni selettivi per l'aggiunta di vancomicina, polimixina e trimethoprim e incubando il tutto in condizioni di microaerofilia [Skirrow e Benjamin, 1980].

Dalla sua scoperta ad oggi sono stati effettuati numerosi studi allo scopo di redigerne una accurata classificazione tassonomica. Molto utili a tale scopo sono stati il sequenziamento del genoma, la caratterizzazione delle proteine dei lipidi della parete cellulare, la caratterizzazione sierologica e l'analisi delle caratteristiche biochimiche del batterio. Oggi sappiamo che il genere *Campylobacter* appartiene al *phylum Proteobacteria* e alla classe *Epsilonproteobacteria*. All'interno di quest'ultima troviamo l'ordine *Campylobacterales* di cui fanno parte la famiglia delle *Helicobacteraceae* (comprendente *Helicobacter* e *Wolinella*) e la famiglia delle *Campylobacteraceae* (nella quale troviamo *Campylobacter*, *Arcobacter* e *Sulfurospirillum*) [Debruyne et al., 2008].

Il genere *Campylobacter* è costituito da batteri Gram-negativi, pleomorfi spesso di forma incurvata (dal greco *Kampylos*, cioè curvo) ad S, elicoidale, spiraliforme o ad “ala di gabbiano”, della lunghezza di 2-5 μm e del diametro di 0,2-0,9 μm (figura 2.1). La loro normale forma è dunque quella bastoncellare, sebbene però vi sia da specificare che in condizioni sub-ottimali tali batteri tendono ad assumere forme coccobacillari ed anche sferiche. Caratteristica è la bassa percentuale di guanina e citosina nel loro DNA [Fitzgerald *et al.*, 2008].

Fig. 2.1: *Campylobacter jejuni*



Sono batteri asporigeni e mobili spesso con andamento a spirale, tale peculiarità viene loro conferita dalla presenza di un flagello polare, o raramente due in posizione bipolare. Tali flagelli possono avere una lunghezza pari ad anche due o tre volte quella della cellula stessa. In alcuni rari casi sono stati segnalati anche ceppi di *Campylobacter* peritrichi [Debruyne *et al.*, 2008]. La motilità e la presenza di flagelli sono legati a due geni, *flaA* e *flaB*, che, a seconda della loro ricombinazione, forniscono maggiore o minore virulenza al patogeno e dunque ceppi mutanti non mobili presentano scarse o nulle caratteristiche di patogenicità [Wassenaar *et al.*, 1993; Young *et al.*, 2007].

Campylobacter sono microrganismi termotrofi (non crescono al di sotto di 25°C) e molto spesso le specie patogene sono termofile (sviluppano abbastanza bene a 37°C ed ottimamente a 41°-42°C). Tenzialmente sono microaerofili e capnofili e per tale ragione crescono meglio con concentrazioni di anidride carbonica superiori a quelle atmosferiche (dal 5 al 10% e oltre) e bassa tensione di ossigeno (dal 5 al 7% o meno) [Humphrey *et al.*, 2007; Fitzgerald *et al.*, 2008]. Tali caratteristiche permettono loro di vivere e proliferare agevolmente nei visceri di molti animali e dell'uomo. Biochimicamente tutte le specie di *Campylobacter* sono piuttosto inattive, come fonte energetica infatti non utilizzano i carboidrati, che sono incapaci di fermentare ed ossidare, non sintetizzano pigmenti e non idrolizzano l'urea, sebbene siano stati trovati dei ceppi UPTC, "*urease-positive thermophilic Campylobacter*" [Bolton *et al.*, 1985; Sekizuka *et al.*, 2002]. Questi batteri traggono quindi il loro nutrimento da amminoacidi e intermedi del ciclo dell'acido tricarbossilico. Tutte le specie del genere *Campylobacter* sono ossidasi positive ed alcune sono anche produttrici di catalasi; tale particolare differenza, anche se non in modo assoluto, gruppi di batteri patogeni (catalasi positivi) da gruppi di batteri in prevalenza non patogeni (catalasi negativi).

La patogenicità di *Campylobacter* è in gran parte dovuta, come detto in precedenza, alla sua maggiore o minore motilità [Wassenaar *et al.*, 1993; Young *et al.*, 2007], alle sue caratteristiche chemiotattiche [Hugdahl *et al.*, 1988; Yao *et al.*, 1997; Hazeleger *et al.*, 1998], alla capacità di aderire alle mucose grazie ad adesine di superficie [Pei *et al.*, 1980; McSweegan e Walker, 1986; Konkel *et al.*, 1997; Schröder e Moser, 1997; Jin *et al.*, 2001] e invadere i tessuti [Everest *et al.*, 1992], alle modificazioni del lipooligosaccaride (LOS) di membrana [Semchenko *et al.*, 2010] ed anche alla produzione di una potente citotossina, la CDT (*cytolethal distending toxin*) [Young *et al.*, 2007] che causa a livello intestinale necrosi ed atrofia dei villi [Babakhani *et al.*, 1993]. Sebbene siano batteri ben equipaggiati per sopravvivere nel lume di visceri, in condizioni avverse la loro resistenza è assai scarsa e la loro capacità di sopravvivere labile. Si inattivano rapidamente se esposti ai normali tenori d'ossigeno atmosferico (20-21%), la loro crescita viene bloccata se l'umidità del loro substrato cala e l'essiccamento ne causa la morte. Anche gli sbalzi termici influenzano la vitalità di tali microrganismi, che vengono inattivati da temperature superiori a 42°- 43°C e non moltiplicano a temperature inferiori a 25°C. Va comunque specificato che *Campylobacter* sopravvivono a temperature di refrigerazione (+4° C) ed inferiori a 20° C, mentre alla temperatura di -20°C resistono da due a cinque mesi. Sono inoltre molto sensibili anche a lievi riduzioni di pH, in particolare la loro crescita e vitalità è notevolmente

ridotta a valori inferiori a 5,5. Se nel substrato il quantitativo di acqua libera scende al di sotto di 0,940 il batterio viene inattivato. Tali microrganismi risultano anche sensibili a luce solare; disinfettanti; trattamenti termici, come pastorizzazione, sterilizzazione e trattamenti UHT; aggiunta di sale nel substrato; sottovuoto; radiazioni ionizzanti; stagionatura; fermentazione ed acidificazione di prodotti alimentari; competizione diretta con altra flora batterica. Durante lo svolgimento della parte pratica di questa tesi, presso l'area di Microbiologia e Malattie Infettive del Dipartimento di Biomedicina comparata e Alimentazione dell'Università di Padova, ho potuto osservare personalmente la sensibilità di questi batteri a condizioni ambientali avverse. Alcuni ceppi da me raccolti, infatti, si sono dimostrati difficili da far crescere e moltiplicare, tanto da richiedere parecchi passaggi da terreni selettivi (agar Karmali e agar CAT) a non selettivi (agar sangue) per permettere una crescita adeguata per lo stoccaggio a -80° C o per l'utilizzo del batterio stesso nel test dell'antibiogramma. Ho notato che se le operazioni di semina si prolungavano troppo, a causa di un elevato numero di campioni o di procedure di laboratorio lunghe, la crescita batterica ne risentiva. Sempre durante la mia esperienza, *Campylobacter* è risultato parecchio sensibile anche a terreni di coltura non molto freschi, tanto che per ovviare al problema preparavo solo il numero di piastre necessario di settimana in settimana.

Il genere *Campylobacter* ad oggi comprende 23 specie [EFSA, 2011], le quali sono ampiamente diffuse in natura e albergate da molte specie animali. Per quanto riguarda la patogenicità, le specie di *Campylobacter* più importanti per l'uomo sono quelle termofile, caratterizzate dal fatto di prediligere una temperatura di 42°C per la loro crescita. Di queste, *C. jejuni* è la specie associata più frequentemente all'infezione umana in Europa [EFSA e ECDC, 2011, 2012] ed in molti Paesi nel mondo [Coker *et al.*, 2002; <http://www.cdc.gov/foodnet/>], seguito per importanza da *C. coli*, *C. lari* ed in minima parte da *C. upsaliensis* [EFSA e ECDC, 2011, 2012]. Il loro ambiente di crescita ideale è il lume intestinale, nel quale trovano tutte le caratteristiche di microaerofilia e temperatura a loro consone. Molti di questi batteri possono causare semplici enteriti autolimitanti, ma alcuni ceppi particolarmente virulenti, possono causare gravi ripercussioni secondarie, come ad esempio alcuni ceppi di *C. jejuni* causa della sindrome di Guillain-Barré [Parkhill *et al.*, 2000; Semchenko *et al.*, 2010]. Essendo questi batteri molto diffusi in natura, avendo numerose vie di trasmissione all'uomo e notevoli ripercussioni sulla salute umana, con conseguenti elevati costi, costituiscono un grave e attuale problema di Sanità Pubblica [EFSA e ECDC, 2011, 2012].

2.2 Aspetti zoonotici delle infezioni da *Campylobacter*

Inizialmente si riteneva che *Campylobacter* fosse un patogeno principalmente degli animali, soprattutto di bovini e ovini, nei quali il sintomo principale era l'aborto. Oggi invece sappiamo che tale batterio è anche causa di zoonosi, la campilobatteriosi, e che nell'uomo risulta uno dei principali, se non il maggiore, responsabile di gastroenteriti a eziologia batterica a livello mondiale [Coker et al., 2002; EFSA e ECDC, 2011, 2012; <http://www.cdc.gov/foodnet/>].

Per comprendere appieno l'importanza di *Campylobacter* come agente di zoonosi si devono esaminare due principali ambiti riguardanti tale patogeno. Uno è sicuramente l'epidemiologia dell'infezione da esso provocata, mentre l'altro è rappresentato dalle modalità con le quali questa problematica viene affrontata sia dal mondo scientifico che da quello politico e quali misure di prevenzione e controllo vengono attuate nei suoi confronti. Mi sembra giusto iniziare a parlare proprio di questo secondo argomento, soprattutto perché mi permette di introdurre e sottolineare l'importanza della campilobatteriosi in Italia e in Europa (ma anche nel mondo).

Dal Parlamento europeo e dal Consiglio dell'Unione Europea il 17 novembre 2003 è stata emanata la Direttiva 2003/99/CE sulle misure di sorveglianza delle zoonosi e degli agenti zoonotici [Direttiva 2003/99/CE., 2003]. In tale documento, nell'Articolo 2, vengono fornite le seguenti definizioni:

- Zoonosi: qualsiasi malattia e/o infezione che possa essere trasmessa naturalmente, direttamente o indirettamente, tra gli animali e l'uomo.
- Agente zoonotico: qualsiasi virus, batterio, fungo, parassita o altra entità biologica che possa causare una zoonosi.
- Resistenza agli antimicrobici: capacità di determinate specie di microrganismi di sopravvivere, se non addirittura di crescere, in presenza di una data concentrazione di un agente antimicrobico sufficiente di solito ad inibire la crescita o ad uccidere microrganismi della stessa specie.
- Sorveglianza: un sistema di raccolta, analisi e diffusione dei dati sull'incidenza di zoonosi, di agenti zoonotici e di resistenza agli antimicrobici ad essi correlati.

Nella stessa Direttiva viene detto che “la protezione della salute umana contro le zoonosi è di importanza capitale”, viene inoltre specificato che “costituiscono fonte di preoccupazione zoonosi trasmissibili attraverso gli alimenti e fonti diverse da questi, in particolare quelle trasmesse dagli animali selvatici e dagli animali da compagnia.” Per questo motivo l’Unione Europea ha deciso che “oltre alla sorveglianza generale possono insorgere esigenze specifiche che possono rendere necessaria l’adozione di programmi coordinati di sorveglianza. Occorre riservare un’attenzione particolare alle zoonosi elencate nell’allegato 1.” Secondo la Direttiva quindi “occorre considerare in via prioritaria le zoonosi che presentano rischi gravi per la salute umana. Tuttavia, i sistemi di sorveglianza dovrebbero anche agevolare il rilevamento di infezioni zoonotiche emergenti o di nuova apparizione e nuovi ceppi di organismi zoonotici. Si rende inoltre necessario sorvegliare la preoccupante insorgenza di resistenza agli antimicrobici.”

Applicando dunque questi concetti a *Campylobacter* risulta che, essendo la campilobatteriosi una zoonosi trasmissibile attraverso sia alimenti di origine animale, sia animali selvatici e domestici, va tenuta sotto stretto controllo tramite un programma di sorveglianza. In particolare, costituendo *Campylobacter* un rischio anche grave per la salute umana, ed essendo causa di ripercussioni economiche elevate per gli Stati membri dell’Unione Europea, esso è stato inserito nell’elenco dell’Allegato 1, come agente zoonotico da sottoporre sempre a sorveglianza (tabella n. 1).

Tab. 1: Estratto dell’Allegato 1 della Direttiva 2003/99/CE sulle misure di sorveglianza delle zoonosi e degli agenti zoonotici.

ALLEGATO I

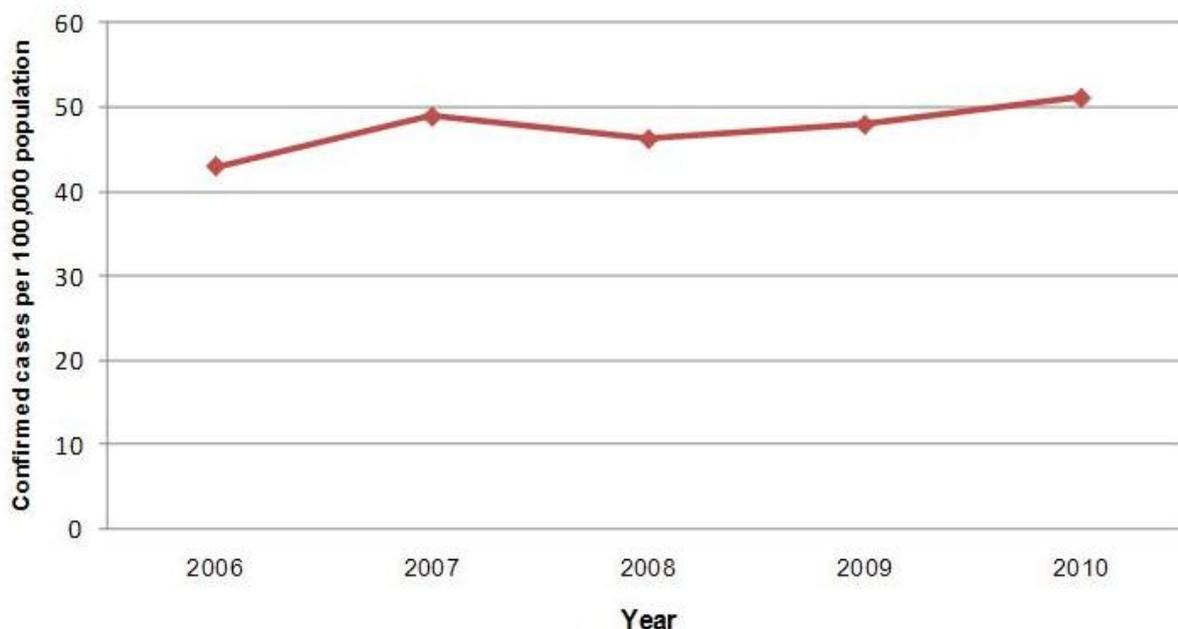
A. Zoonosi ed agenti zoonotici da sottoporre a sorveglianza

- Brucellosi e relativi agenti zoonotici
- **Campilobatteriosi e relativi agenti zoonotici**
- Echinococcosi e relativi agenti zoonotici
- Listeriosi e relativi agenti zoonotici
- Salmonellosi e relativi agenti zoonotici
- Trichinellosi e relativi agenti zoonotici
- Tubercolosi causata da *Mycobacterium bovis*
- *Escherichia coli* che produce verocitotossine

2.2.1 Diffusione dell'infezione da *Campylobacter* nell'uomo

Per inquadrare il fenomeno della diffusione delle infezioni umane da *Campylobacter* nell'Unione Europea si deve far riferimento innanzitutto agli studi effettuati e ai dati diffusi dall'Autorità europea per la Sicurezza Alimentare [EFSA e ECDC, 2011, 2012]. Nel corso degli ultimi anni questo ente ha pubblicato *report* annuali riguardanti le zoonosi e gli agenti zoonotici; tra questi, a partire dal 2005, viene dato particolare rilievo a *Campylobacter* che, nonostante si manifesti maggiormente con casi di malattia sporadici e non epidemici, è tuttora in continuo e costante aumento in molti Stati. Già i dati relativi al 2005 dimostravano che rispetto all'anno precedente i casi di infezione da *Campylobacter* erano aumentati di circa il 7,8%, arrivando quell'anno a superare le salmonellosi [EFSA e ECDC, 2011, 2012]. Nell'ultimo *report*, pubblicato dall'EFSA nel 2012 e riguardante l'anno 2010, si nota che, rispetto agli anni precedenti, i casi accertati sono in numero quasi costante, sebbene negli ultimi anni si sia evidenziato un leggero incremento dei casi confermati [EFSA e ECDC, 2012]. Questi ultimi nel 2005 ammontavano a 195.426, diventati 212.064 nel 2010; va però sottolineato che questa crescita non è stata costante negli anni, ma ha avuto un andamento altalenante (figura 2.2).

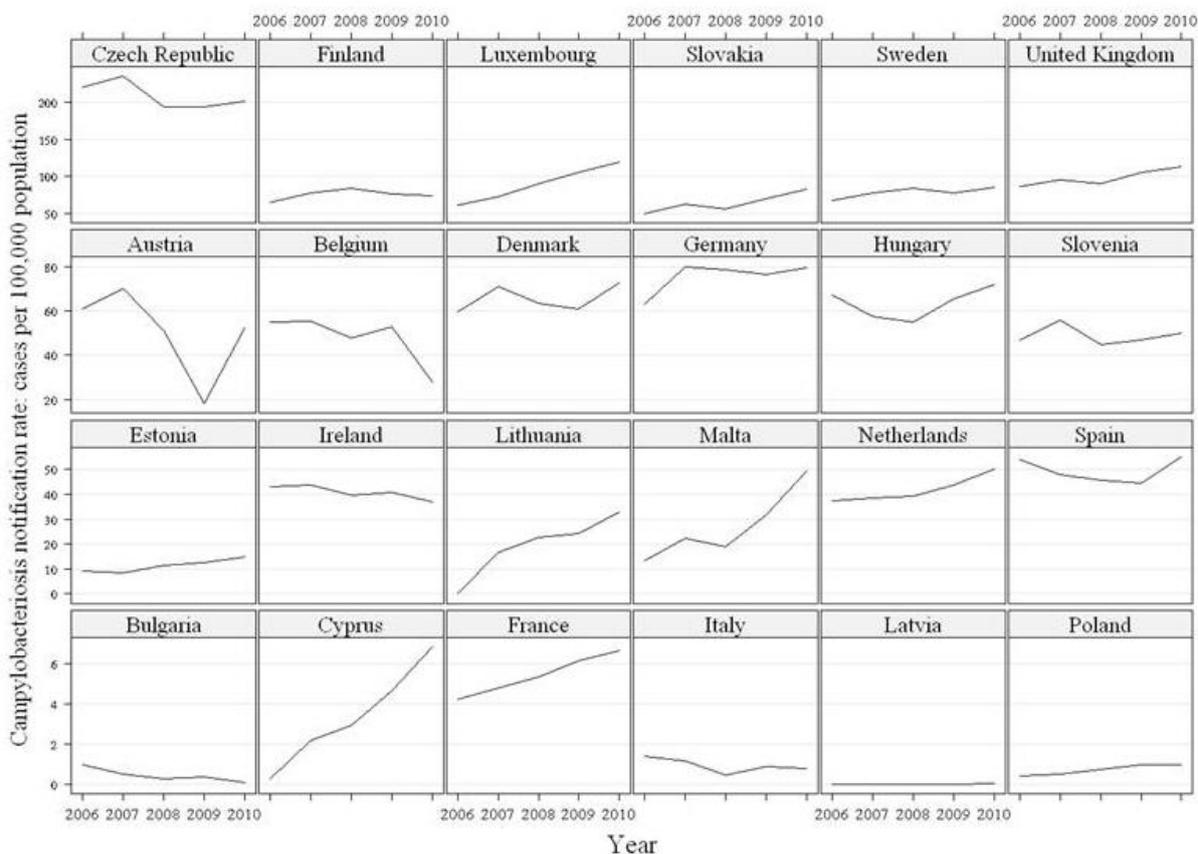
Fig. 2.2: Variazioni annue dei casi confermati in Europa di campilobatteriosi umana.



Nel 2010, secondo i dati forniti dall'EFSA, il numero dei casi confermati di campilobatteriosi nell'uomo nell'Unione Europea è aumentato del 6,7% rispetto al 2009,

passando così in media da 45,6 a 48,6 casi ogni 100.000 abitanti. Sono stati inoltre segnalati in quell'anno 266 decessi a causa di tale zoonosi. Complessivamente nel 2010 numerosi Stati membri hanno registrato un aumento delle infezioni confermate rispetto agli anni precedenti. Il maggior incremento nel tasso di notifica dal 2006 al 2010 è stato osservato in Stati come Cipro, Estonia, Francia, Lussemburgo, Malta, Paesi Bassi, Polonia e Slovacchia, ma soprattutto nel Regno Unito. Non tutti gli Stati membri però mostrano una casistica crescente, infatti Paesi come Belgio, Bulgaria ed Irlanda hanno registrato un calo delle notifiche della malattia (figura 2.3).

Fig. 2.3: Variazioni annue dei casi confermati di campilobatteriosi umana in vari Stati europei.



Deve essere però sottolineato che tali dati vengono considerati, da tutti gli esperti e dall'EFSA stessa, incompleti, perché sottostimanti [<http://www.epicentro.iss.it/>]. Questa sottostima è causata da vari fattori correlati al patogeno e all'evoluzione della campilobatteriosi, al sistema di diagnosi della malattia e all'efficienza dei sistemi di sorveglianza dei vari Stati membri dell'Unione Europea. La campilobatteriosi, come specificherò più avanti, è una malattia con una sintomatologia variabile e più o meno grave, influenzata da fattori intrinseci al batterio e all'ospite. Molto spesso la malattia risulta autolimitante e il suo decorso si risolve in pochi giorni con sintomi blandi e senza

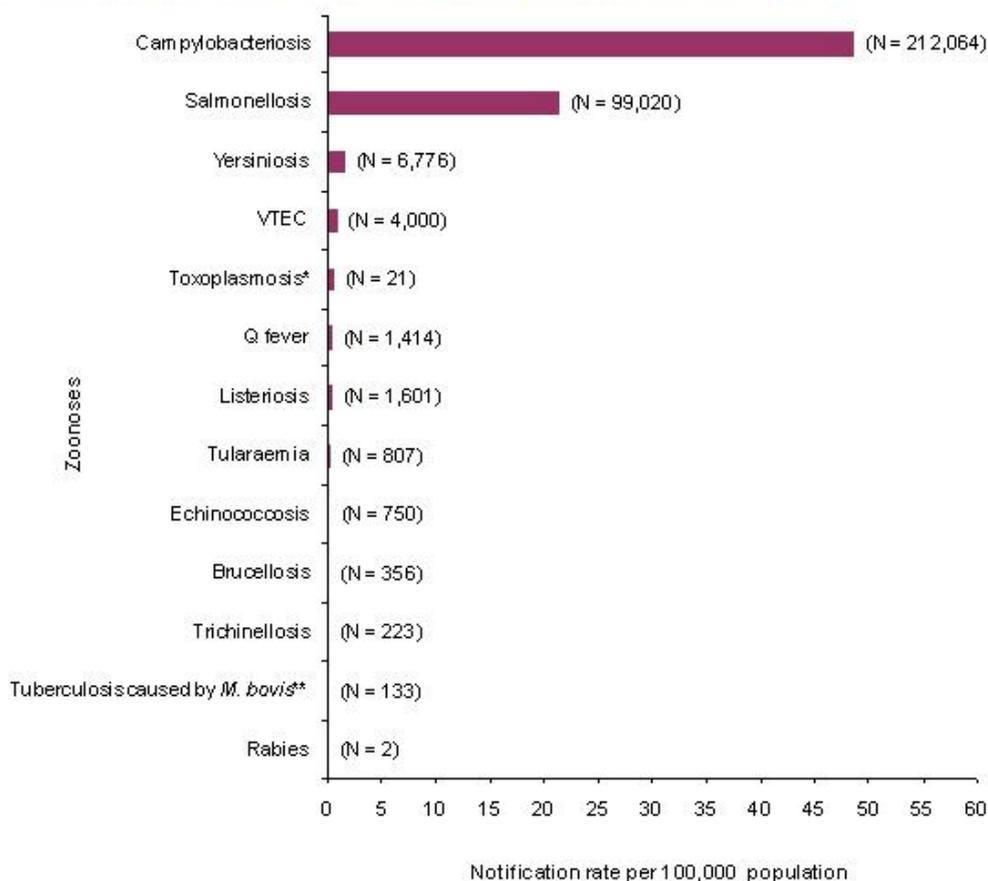
l'uso di farmaci, pertanto spesso non richiede visite cliniche e nemmeno il riconoscimento del patogeno tramite colture fecali, procedure che si attuano invece per casi più gravi. Si può capire come quindi una buona percentuale di casi non venga diagnosticata e quindi segnalata. Un'altra causa di sottostima, in ambito europeo, della prevalenza della campilobatteriosi è la mancanza di piani di sorveglianza in alcuni Stati membri come Portogallo e Grecia, mentre in altri sembra che il sistema di sorveglianza, da poco avviato, non funzioni ancora adeguatamente, come sembra avvenire soprattutto per Romania, Bulgaria, Lettonia e Polonia. Osservazioni simili sono applicabili alla situazione italiana, dove la campilobatteriosi non è una malattia notificabile. È interessante notare come, a differenza di altri Paesi con una densità di popolazione simile (Regno Unito) o minore (Lussemburgo) a quella italiana, nel nostro Paese ci sia un bassissimo numero di casi confermati. In Italia nel 2010 i casi confermati sono stati 457 (0,76 casi ogni 100.000 abitanti) contro i 70.298 del Regno Unito (113,37 casi ogni 100.000 abitanti) e i 600 casi del Lussemburgo (119,51 casi ogni 100.000 abitanti). Questa differenza di casistica potrebbe essere spiegata dal fatto che sia il Regno Unito sia il Lussemburgo hanno, come vedremo più avanti, una prevalenza maggiore di carcasse di pollo contaminate da *Campylobacter*, quindi una maggiore probabilità di insorgenza della malattia, visto che il consumo di carne di pollo contaminata è la principale via di trasmissione dell'infezione all'uomo. Se però confrontiamo la nostra situazione con quella di Paesi come il Belgio o la Lituania (figura 2.8), che presentano una percentuale di carcasse di pollo contaminate simile all'Italia, notiamo che nel 2010 il Belgio presentava 27,96 casi ogni 100.000 abitanti per un totale di 3.031 casi confermati, mentre in Lituania ci sono stati 32,89 casi ogni 100.000 abitanti con un totale di casi confermati pari a 1.095 [EFSA e ECDC, 2012]. Ciò fa pensare che molti casi, sia nel nostro Paese che in altri, non vengano riportati alle Autorità competenti o neppure diagnosticati.

Nonostante questa sottostima si può comunque affermare che solo con i casi confermati *Campylobacter* risulta il maggior agente batterico di gastroenteriti al mondo e l'agente eziologico della zoonosi più diffusa in Europa (figura 2.4) [EFSA e ECDC, 2011, 2012]. Come detto in precedenza, il numero di infezioni annue provocate da questo patogeno sembra aumentare e dal 2005 ha superato malattie come le salmonellosi, i cui casi sembrano essere in diminuzione [EFSA e ECDC, 2012].

Anche negli Stati Uniti d'America la malattia risulta una delle più comuni, se non la maggiore, causa di gastroenteriti e diarree umane. Anche negli U.S.A. la quasi totalità dei casi che vengono confermati ogni anno corrisponde ad eventi sporadici o a casi isolati,

mentre sono rarissime le epidemie dovute a questo batterio. Nel 1982 il *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) ha avviato in questo Paese un sistema di sorveglianza nazionale su *Campylobacter* e nel 1996 ha istituito un sistema di sorveglianza attiva denominato *FoodNet* [<http://www.cdc.gov/foodnet/>], con lo scopo di monitorare l'incidenza e la tendenza a sviluppare infezione di *Campylobacter* nel tempo, e di condurre studi per identificare i fattori di rischio correlati alla malattia. La sorveglianza attiva attraverso *FoodNet* indica che negli U.S.A. ogni anno vengono segnalati circa 13 casi ogni 100.000 abitanti, con oltre 2,4 milioni di persone colpite ogni anno, pari a circa lo 0,8% della popolazione. Anche in questo ambito però si deve sottolineare come tutti gli esperti ritengano che molti casi non vengano diagnosticati o non dichiarati causando così una sottostima del problema.

Fig. 2.4: Casi confermati di campilobatteriosi umana confrontati con altre zoonosi a livello europeo.



Nei Paesi in via di sviluppo la malattia è presente e colpisce, per non dire flagella, i bambini soprattutto al di sotto di due anni. In questi Paesi non esistono piani di sorveglianza e quindi non vi sono dati precisi relativi alla diffusione del patogeno e al numero di casi annui. In base ai pochi studi effettuati, i casi di campilobatteriosi nei Paesi in via di sviluppo vanno da 5 a 20% ed in media sono colpite 90 persone di tutte le età

ogni 100.000 abitanti. In tali Paesi la fascia di popolazione più colpita è quella infantile con 40.000-60.000 casi su 100.000 abitanti [Coker et al., 2002].

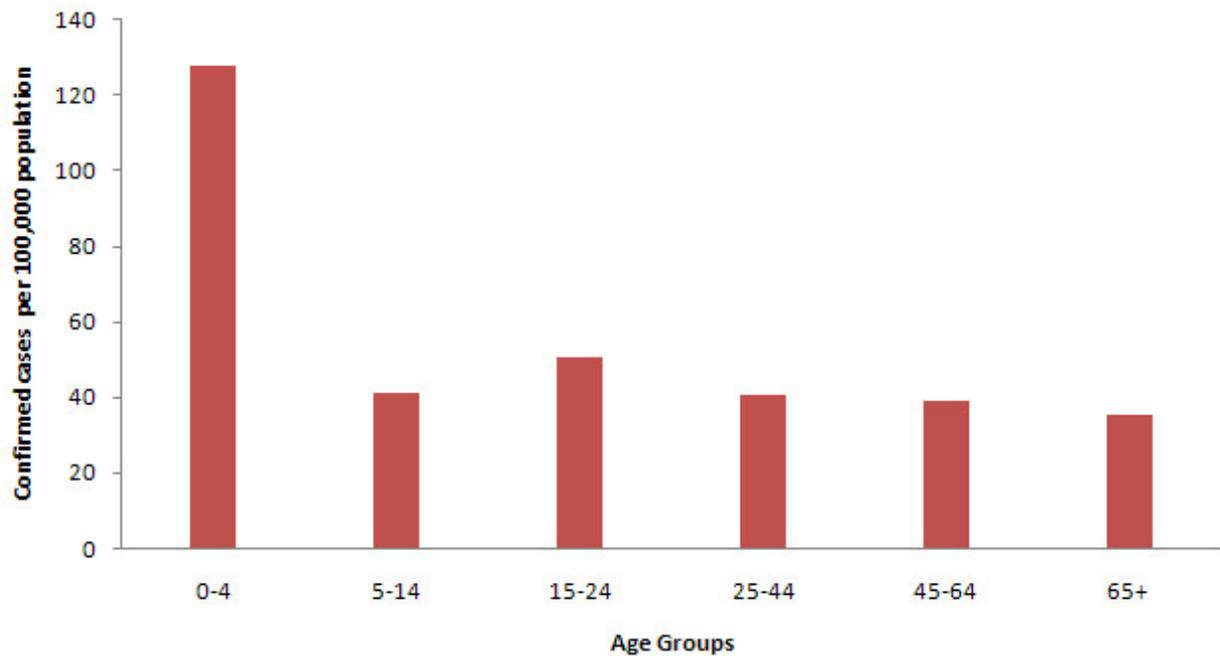
2.2.2. Campilobatteriosi: nozioni generali

L'uomo può essere infettato da *Campylobacter* in diverse situazioni, principalmente tramite l'assunzione di cibi, acqua e latte o per contatto diretto con animali infetti (figura 2.7). Rara è la trasmissione da persone infette a persone sane. La dose infettante si è rivelata sperimentalmente molto bassa e in alcuni individui (spesso bambini, anziani o persone immunocompromesse) sono sufficienti 500 ufc (unità formanti colonia) per scatenare la patologia [Black et al., 1988]. Il periodo di incubazione varia da due a cinque giorni ed in alcuni casi può arrivare anche a superare la settimana. I sintomi nella maggior parte dei casi sono di lieve entità e spesso di durata limitata, da un giorno fino a una settimana, e la malattia di solito è autolimitante. Si possono riscontrare nausea, vomito, febbre, diarrea, dolori addominali, dolori muscolari e cefalea. In alcuni casi la sintomatologia può aggravarsi ed esitare in diarrea emorragica. Nel 20% dei pazienti il disturbo può prolungarsi oltre i dieci giorni, mentre in altri soggetti dopo la scomparsa dei sintomi la malattia può ripresentarsi a distanza di qualche giorno.

Manifestazioni più gravi della campilobatteriosi si riscontrano in meno dell'1% dei pazienti e spesso a manifestarle sono soggetti con patologie gravi e debilitanti o bambini e anziani. Sono stati segnalati casi di meningite, endocardite, aborto settico, colite ricorrente, colecistite acuta, epatite e nefrite, e nei pazienti immunocompromessi anche gravi setticemie che colpiscono tutti gli organi. La campilobatteriosi può avere anche sequele croniche molto gravi come l'artrite reattiva, la sindrome di Reiter, la sindrome di Guillain-Barré (una poliradiculopatia infiammatoria acuta e demielinizzante dovuta ad una risposta immunitaria aberrante scatenata dal batterio) e la sindrome di Miller-Fisher (oftalmoplegia acuta, atassia sensitiva, iporeflessia, anche in questo caso dovuta a reazioni immunitarie aberranti causate da *Campylobacter*). I decessi sono rari: si stima che per ogni mille casi ve ne sia in media uno, soprattutto fra i pazienti più debilitati.

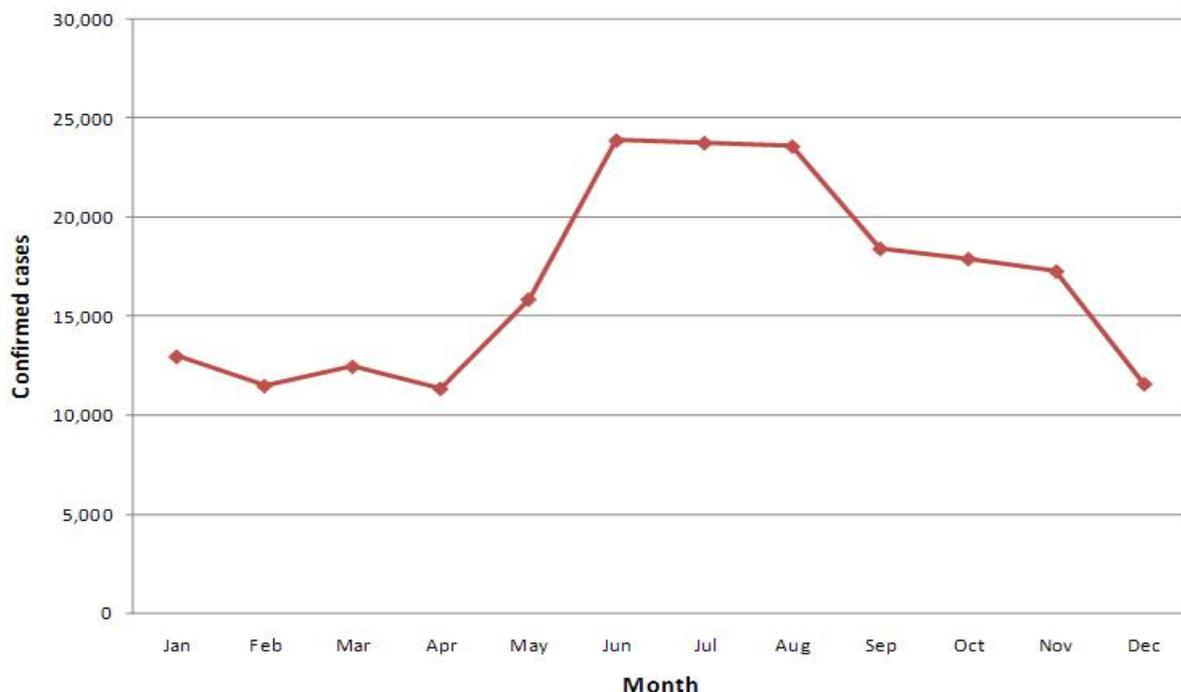
Dai dati pubblicati dall'EFSA [EFSA e ECDC, 2011, 2012] possiamo osservare che la campilobatteriosi in Europa colpisce prevalentemente i bambini al di sotto dei cinque anni d'età (figura 2.5). Nel 2010 le specie più frequentemente isolate da pazienti con la patologia in atto sono state *C. jejuni* nel 93,4% dei casi, *C. coli* nel 2,3% dei casi, e meno frequentemente *C. lari* e *C. upsaliensis*.

Fig. 2.5: Casi confermati in Europa di campilobatteriosi umana nelle varie fasce d'età.



Altra particolarità di tale patologia è che fra i mesi di giugno e agosto in Europa si è verificato un aumento dei casi di campilobatteriosi e una diminuzione invece si è riscontrata da settembre a dicembre (figura 2.6). Questi dati indicano che *Campylobacter* presenta una certa stagionalità e che a seconda della stagione presa in considerazione si hanno maggiori o minori probabilità di contrarre il patogeno [EFSA e ECDC, 2011, 2012].

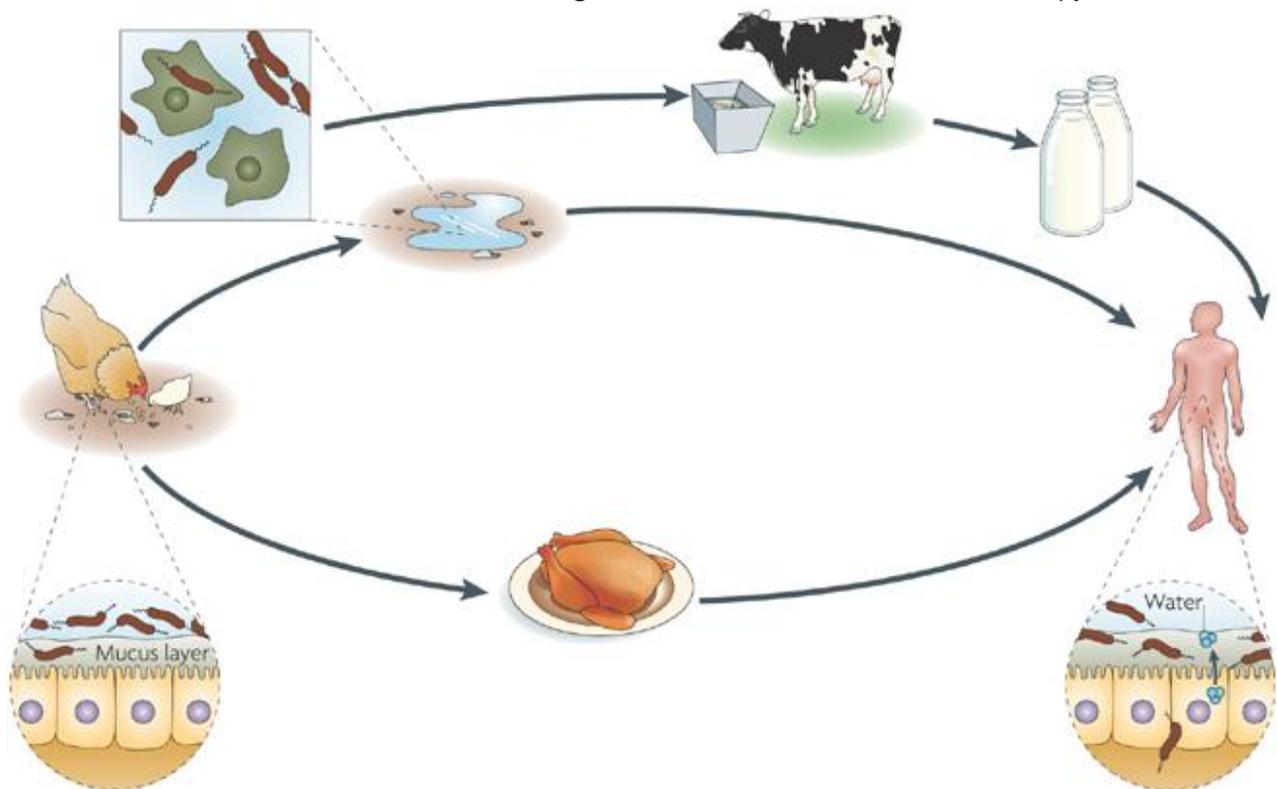
Fig. 2.6: Modificazioni stagionali dell'insorgenza della campilobatteriosi umana in Europa.



2.2.3 Trasmissione di *Campylobacter* all'uomo

La maggior parte dei casi di campilobatteriosi si verifica come eventi sporadici [EFSA e ECDC, 2011, 2012], molto raramente invece questa infezione assume caratteristiche epidemiche [Alary e Nadeau, 1990; CDC, 2002; Peterson, 2003]. *Campylobacter* è un batterio molto diffuso in natura e si può trovare nel terreno e nell'acqua, ma il serbatoio principale di tale patogeno è l'intestino, di uccelli e mammiferi selvatici o domestici. L'uomo può infettarsi principalmente in quattro modi: tramite alimenti contaminati consumati crudi o poco cotti; tramite alimenti cotti e contaminati successivamente (cross-contaminazione); per contatto diretto con animali o più raramente con persone infette; e a causa di contaminazione ambientale (figura 2.7) [EFSA, 2005; Young *et al.*, 2007].

Fig. 2.7: Alcune vie di trasmissione di *Campylobacter* all'uomo.



Gli alimenti rappresentano un'importante fonte di trasmissione di *Campylobacter* all'uomo, fra questi in primo luogo spiccano la carne fresca e gli alimenti a base di carne (figura 2.9), ma il microrganismo viene isolato anche da latte e latticini, pesce, prodotti ittici, molluschi bivalvi e verdure fresche. I dati riportati di seguito sono estratti dai *report* EFSA riguardanti Zoonosi e Agenti Zoonotici relativi agli anni 2009 e 2010 [EFSA e ECDC, 2011, 2012].

Tratterrò in dettaglio nel prossimo capitolo quali specie di animali, spesso a contatto con l'uomo, sono più soggette a essere colonizzate e quindi a diffondere *Campylobacter*. In questo capitolo parlerò invece della trasmissione del batterio all'uomo per via alimentare.

2.2.3.1 Fonti alimentari di casi sporadici di campilobatteriosi

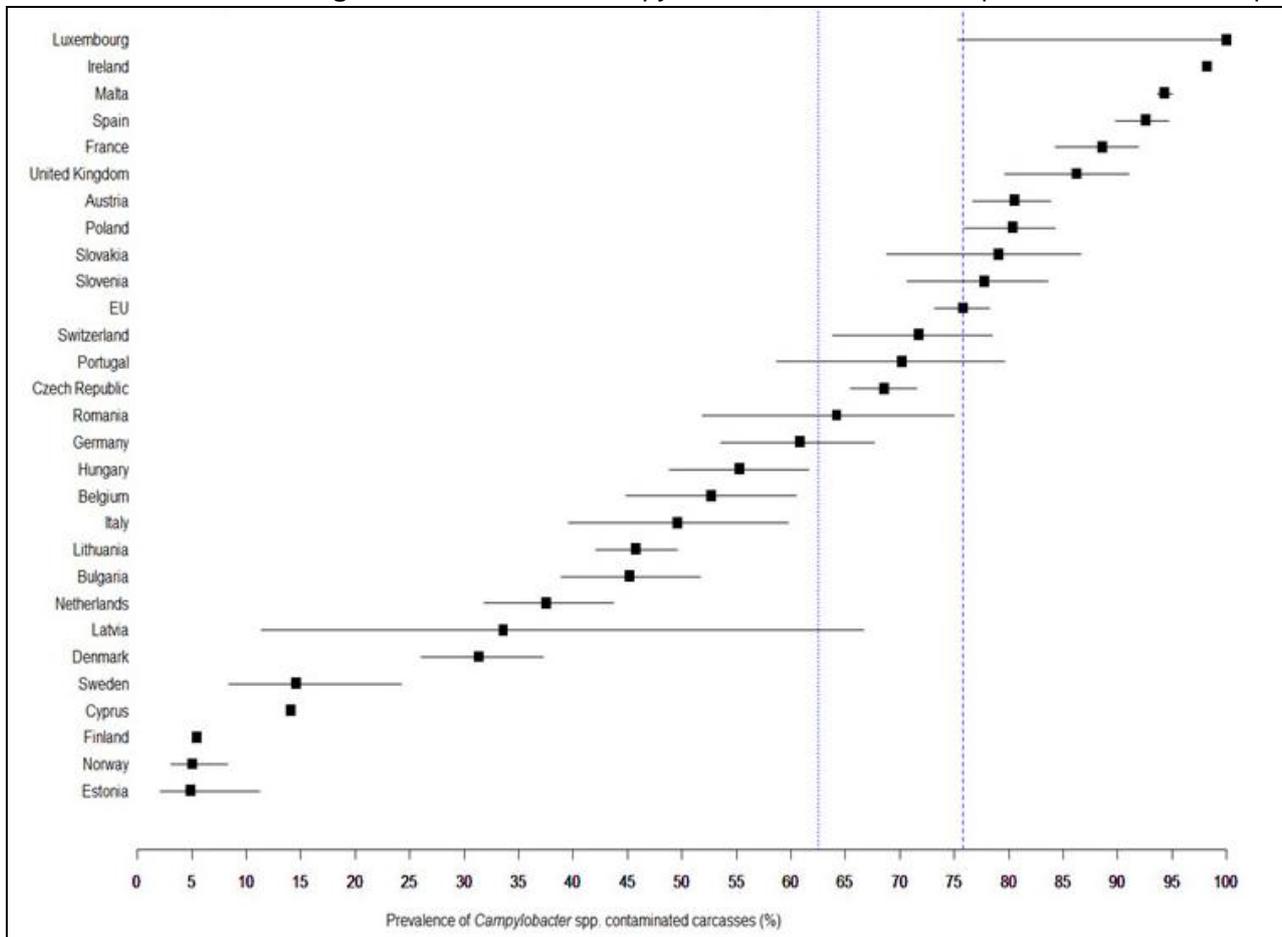
Il pollo da carne, o broiler, è uno dei maggiori *reservoir* di *Campylobacter*, tanto che si ritiene essere la causa del 50-80% dei casi di campilobatteriosi umana in Europa. Parte di questa percentuale è dovuta al consumo di **carne di pollo** che determina il 20-30% dei casi di malattia nell'uomo [EFSA e ECDC, 2011, 2012].

Nel 2008 è stata condotta su scala europea un'indagine per verificare la prevalenza di *Campylobacter* in carcasse di pollo. Vi hanno aderito ben ventisei Stati membri dell'Unione Europea, oltre a Norvegia e Svizzera. In ognuno dei Paesi partecipanti, il batterio è stato isolato dalle carcasse di pollo da carne con una prevalenza media del 75,8%, anche se fra i vari Stati membri le differenze sono state molte: Estonia 4,9% e Lussemburgo 100% (figura 2.8). Complessivamente circa la metà dei campioni analizzati conteneva meno di 10 ufc/g, il 12,5% conteneva da 10 a 99 ufc/g, il 19,3% è risultato avere tra i 100 ed i 999 ufc/g, il 15,8% aveva da 1.000 a 10.000 ufc/g ed il 5,8% possedeva più di 10.000 ufc/g. Ventidue Paesi, hanno segnalato campioni con più di 10.000 ufc/g e tutti i Paesi, tranne la Norvegia, hanno segnalato campioni contenenti da 1.000 a 10.000 ufc/g. Con l'identificazione di specie sono stati riconosciuti i seguenti *Campylobacter*: il 67,9% dei campioni positivi presentavano *C. jejuni*, il 39,4% *C. coli*, mentre meno dell'1% dei campioni presentava *C. lari*. *C. jejuni* è stata la specie più frequentemente isolata sia complessivamente che in venti Stati membri e nei due non membri. Sei Stati membri, fra i quali l'Italia, hanno però rilevato una maggior prevalenza di *C. coli* nelle carcasse.

Oltre alla carne di pollo, nel 2010 sette Stati membri hanno anche verificato la prevalenza di *Campylobacter* nella carne di tacchini d'allevamento o di altri volatili domestici. La media di campioni positivi nei tacchini è stata del 29,5%. Ungheria, Italia, Belgio e Spagna hanno inoltre ricercato il batterio nelle carni di altri volatili (oche, anatre e galline ovaiole) trovando

una prevalenza media del 24,2%. Tali percentuali indicano che la carne di volatili in genere, e non solo la carne di broiler, può essere un veicolo importante di *Campylobacter* all'uomo.

Fig. 2.8: Prevalenza di *Campylobacter* nelle carcasse di pollo nei vari Stati europei.



Nonostante siano pochi gli Stati membri dell'Unione Europea che hanno effettuato ricerche sulla presenza di *Campylobacter* nelle **carni suine**, i dati disponibili sembrano confermare che la carne di maiale venduta al dettaglio è solo raramente o eccezionalmente contaminata dal batterio. Nel 2010 la percentuale media di campioni positivi di carne suina in vendita al dettaglio è risultata del 0,6%. Tali dati sono estremamente diversi da quelli riguardanti il pollo, poiché anche se i maiali in allevamento presentano comunque elevate prevalenze di *Campylobacter*, questo non si riscontra nelle carni (figura 2.9). La causa principale di questo fenomeno risiede nelle diverse tipologie di macellazione fra avicoli e suini/bovini, che comporta una minore contaminazione fecale delle carni delle ultime due specie (EFSA e ECDC, 2012).

Nel 2010 solo cinque Stati membri hanno riportato dati riguardanti la **carne di bovino** in vendita al dettaglio. La media delle prevalenze riscontrate in questi Paesi è stata dello 0,4%. L'Ungheria ha inoltre eseguito un'analisi sulla variazione della presenza di *Campylobacter* durante le varie fasi di lavorazione e vendita della carne di bovino ed ha registrato una diminuzione di tali batteri dal macello al settore di lavorazione della carne, sino al settore di vendita. In Italia un'indagine su questo tipo di carni è stata effettuata nel 2007 portando alla luce una prevalenza del 2,7%. Per i bovini, come per i maiali, si nota un'elevata presenza di *Campylobacter* in allevamento, ma una bassissima presenza nella carne (figura 2.9).

Anche per i prodotti di carne **ready-to-eat** solo pochi fra gli Stati membri dell'Unione Europea hanno effettuato dei campionamenti durante il 2010. Irlanda, Germania e Slovacchia hanno campionato prodotti derivati dalla lavorazione di carni di pollo, tacchino, mentre solo l'Irlanda ha campionato derivati di carne suina e bovina. In nessuna di queste carni è stato trovato il patogeno, tranne che in Irlanda nella carne lavorata di pollo (0,8% di positività) e in Germania con 6,3% nella carne lavorata di pollo e con un 2,8% nella carne lavorata di tacchino.

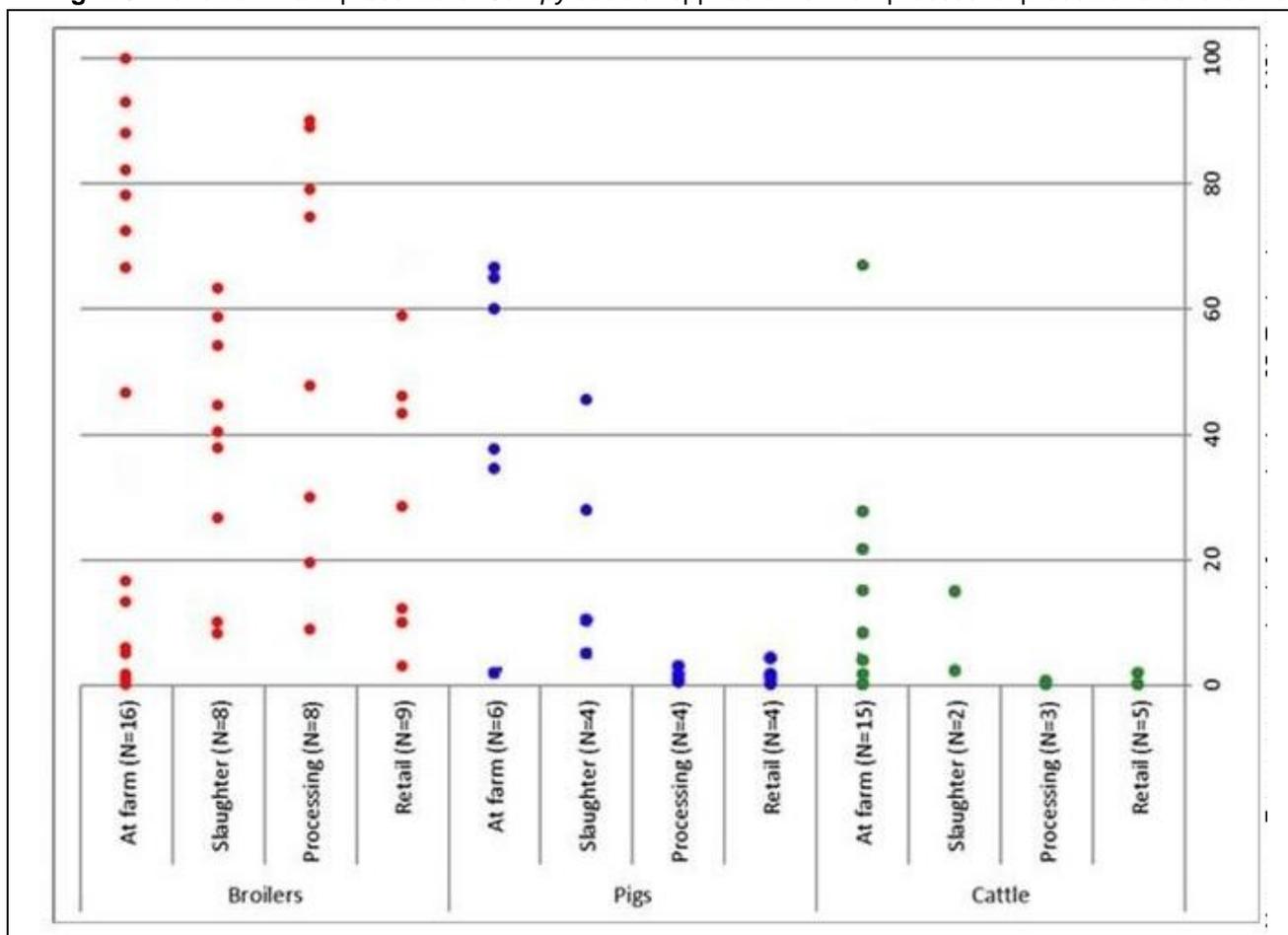
Anche il **latte** è un alimento nel quale possiamo trovare *Campylobacter*. In Europa, negli Stati membri che hanno ricercato il batterio nel latte crudo bovino, la sua prevalenza variava dallo 0% (Germania e Italia) al 2,7% (Slovacchia). Per quanto riguarda la produzione casearia, il patogeno è stato rinvenuto sia in Italia (nel 2,4% dei campioni) sia in Belgio (4,1%), soprattutto in formaggi prodotti con latte crudo.

Oltre che nei suddetti alimenti, la presenza di *Campylobacter* è stata ricercata nel 2010 da alcuni Stati membri dell'Unione Europea in **frutta** e **verdura** e dall'indagine è risultato che nessun campione conteneva tale patogeno, solo in Italia vi era un 8,3% di positività nei campioni vegetali. Nei Paesi Bassi nel 2009 sono state testate **spezie** ed **erbe aromatiche** trovandovi una positività al microrganismo dello 0,04%.

Anche i **molluschi bivalvi** possono essere contaminati da *Campylobacter* e molti di questi, soprattutto le ostriche, rappresentano un pericolo per il consumatore quando vengono assunti crudi o poco cotti. È pertanto importante un attento controllo della qualità dell'acqua utilizzata durante l'allevamento, la raccolta e la depurazione dei molluschi [EFSA, 2005].

Fra gli alimenti si nota quindi che in Europa la principale fonte di *Campylobacter* è rappresentata dalla carne, specialmente quella di pollo. È inoltre importante notare un particolare fondamentale, messo in risalto dalla figura 2.9 e rimasto invariato negli anni 2009 e 2010: la prevalenza di *Campylobacter* è molto alta a livello di allevamenti nelle tre principali specie animali da carne allevate in Europa, vale a dire bovino, suino e pollo. Nelle fasi successive della filiera alimentare però si nota una drastica riduzione della popolazione di *Campylobacter* passando dalla macellazione, alla lavorazione, fino alla vendita della carne di bovino e suino, fino ad arrivare a livelli vicini allo zero. Ciò invece non accade per la carne di pollo, nella quale le concentrazioni del batterio permangono sempre a livelli elevati fino alla vendita al dettaglio. Oltre alla minor contaminazione fecale delle carcasse di suino e bovino rispetto a quelle avicole in fase di macellazione, questi dati sembrano suggerire come *Campylobacter* possa risultare meno adattabile alle carni bovine e suine, rispetto a quelle avicole, quindi meno capace di sopravvivere in esse durante le fasi di lavorazione e vendita [EFSA e ECDC, 2012].

Fig. 2.9: Variazioni nella presenza di *Campylobacter* spp. durante i vari processi di produzione della carne.



2.2.3.2 Fonti alimentari di epidemie di campilobatteriosi

Il secondo modo in cui la campilobatteriosi si manifesta è in forma epidemica. Epidemie di infezione da *Campylobacter* sono state associate, in tutto il mondo, al consumo di acque potabili esposte a livelli troppo bassi di cloro, oppure non trattate [Alary e Nadeau, 1990]. Si può quindi ben capire come anche acque non potabili risultino un grave rischio per la salute umana e una possibile fonte di infezione. Bisogna però sottolineare che dagli Stati membri dell'Unione Europea nel 2009 e 2010 non è stato riportato nessun dato riguardante la presenza di *Campylobacter* nell'acqua potabile [EFSA e ECDC, 2011, 2012]. Gli esperti ritengono che l'acqua potabile vada sempre clorata e nel caso in cui le persone vogliano consumare acqua di origine non controllata dovrebbero essere informate e consapevoli del fatto che assumere tale sostanza può comportare dei rischi per la salute [EFSA, 2005]. Un'altra possibile causa di epidemie da *Campylobacter* è stata identificata nel latte crudo o non trattato [CDC, 2002; Peterson, 2003]. Invece il problema non si pone se il latte viene sottoposto a pastorizzazione, sterilizzazione o trattamenti UHT, poiché grazie a tali processi il batterio viene eliminato. Raramente si sono verificate epidemie per contaminazione di intere partite o lotti di carne, soprattutto di pollame. Delle sedici epidemie verificatesi in Europa nel 2009, solo di alcune si è potuta verificare l'origine: sette sono state associate a carni di pollame contaminate, una era riconducibile ad alimenti derivati dal latte diversi dai formaggi e due focolai hanno avuto origine da carne bovina o prodotti derivati da essa [EFSA e ECDC, 2011]. Nel 2010 diciassette casi sono stati causati da carne di pollo contaminata e cinque dal consumo di latte crudo [EFSA e ECDC, 2012].

2.3 *Campylobacter* negli Animali

In natura *Campylobacter* termofili sono molto comuni e il serbatoio principale di tali batteri è il tratto intestinale di uccelli e mammiferi domestici e selvatici. La presenza di *Campylobacter* è stata riscontrata nel pollo e in altri volatili domestici, uccelli selvatici, maiali, cani, gatti, pecore e bovini [Horrocks *et al.*, 2009]. Alcune specie di *Campylobacter* sono state isolate da feci di altri animali, come tartarughe [Harvey e Greenwood 1985], criceti [Fox *et al.* 1983] e scimmie [Tresierra-Ayala e Fernandez 1997]. Fra tutte queste specie, quella che svolge il maggior ruolo di serbatoio, è senza dubbio il pollo, tanto che il contatto diretto con avicoli e il consumo delle loro carni sono considerate come le principali vie di trasmissione del batterio all'uomo [EFSA, 2005; EFSA e ECDC, 2011, 2012].

Dai dati pubblicati dall'EFSA relativamente al 2009 e al 2010 viene messo in risalto come in Europa vi sia un'alta prevalenza di *Campylobacter* in molte specie di animali domestici [EFSA e ECDC, 2011, 2012].

Nei **polli da carne** Stati come Francia, Ungheria, Romania hanno rilevato una presenza media del 72,3% nei singoli animali. In altri Stati invece in media il 18,2% degli allevamenti è risultato positivo, ma con percentuali molto elevate in alcuni Paesi come Spagna (82,2%), Slovenia (92,9%) e Repubblica Ceca (72,4%). Solo in tre Paesi nordici (Finlandia, Norvegia ed Estonia) la prevalenza era uguale o inferiore al 6%. La Germania ha riferito sulla presenza del microrganismo nei **tacchini**, con una positività del 66,2% negli allevamenti testati.

Anche per quanto riguarda i **suini** la presenza di *Campylobacter* varia molto da Stato a Stato, con percentuali di positività comprese tra 1,8% e 66,7%.

Per quanto riguarda i **bovini** la prevalenza di *Campylobacter* era molto bassa in quasi tutti gli Stati europei, tranne che in Austria (27,4%), Spagna (67%), Norvegia (21,5%) e Svizzera (15,1%). I pochissimi dati di prevalenza in **capre** e **pecore** riportano una positività pari ad 1,9% nella prima specie e a 4,6% nella seconda.

Non per tutti i campioni positivi riscontrati in Europa durante il 2009 e il 2010 è stata identificata la specie, quindi a tal riguardo l'EFSA dispone di informazioni ridotte e non approfondite. *C. jejuni* era la specie più comunemente isolata nei polli da carne (30,6% sia

nel 2009 sia nel 2010) e nei bovini (63,7% nel 2009 e 77,9% nel 2010), mentre nel suino predomina *C. coli* (84,2% nel 2009 e 50,2% nel 2010). Questi dati riflettono quanto noto in generale sulla distribuzione di specie di *Campylobacter* nei principali animali da reddito.

2.4 *Campylobacter* nel cane e nel gatto

Il cane e il gatto, da alcuni anni, sono stati identificati come possibili serbatoi di *Campylobacter*. L'infezione in questi animali può decorrere in assenza di sintomi evidenti o provocare diarrea più o meno grave [Acke *et al.*, 2009]. Oltre alla sua rilevanza clinica, la presenza di *Campylobacter* in specie, come cane e gatto, è un fatto di estremo interesse dal punto di vista della Salute Pubblica. Infatti, il contatto con animali infetti si è dimostrato un fattore di rischio per l'insorgenza di campilobatteriosi nell'uomo e l'effettiva trasmissione da animali da compagnia a persone è stata anche dimostrata [Wolfs *et al.*, 2001]. Oltre ad essere un patogeno primario, *Campylobacter* in cane e gatto può agire anche da agente secondario che instaura infezioni opportunistiche in corso di insufficienza del pancreas esocrino, parassitosi intestinali, infezioni da Coronavirus e Parvovirus [Acke *et al.*, 2009].

Nel 2009 l'EFSA ha pubblicato dati riguardanti la prevalenza di *Campylobacter* in cane e gatto in alcuni Paesi dell'Unione Europea e in Norvegia e Svizzera. Da questi dati è emersa per il cane una positività media del 9,1% negli Stati dell'U.E., con un'ampia variabilità da Stato a Stato, dello 0,9% in Svizzera e del 27,5% in Norvegia. Anche per i gatti la situazione è simile con una positività media del 9,6% negli Stati dell'U.E., dello 0,3% in Svizzera e del 9,3% in Norvegia [EFSA e ECDC, 2011]. Nel 2010 è stata osservata una prevalenza media di *Campylobacter* nei cani pari al 12,2% in U.E., del 31,6% in Norvegia e del 0,4% in Svizzera. Nel gatto invece la prevalenza media degli Stati membri è stata del 4,3%, in Norvegia del 9,3% e in Svizzera dello 0,1% [EFSA e ECDC, 2012]

Oltre ai dati forniti dall'EFSA devono venir presi in considerazione studi effettuati in alcuni Stati Europei e non solo, allo scopo di indagare sulla presenza di *Campylobacter* nella popolazione canina e felina. I dati riportati in tali ricerche sono talvolta molto differenti e anche discordanti ed è necessario considerare che tali diversità possono essere dovute a fattori come il periodo del campionamento, le temperature medie dello Stato in cui si è

svolta la ricerca, il metodo di campionamento adottato, la tipologia dei campioni raccolti ed anche il numero di animali campionati.

Acke *et al.* hanno effettuato nel 2009 uno studio sulla prevalenza di specie termofile di *Campylobacter* in cani e gatti in Irlanda. Il campionamento è stato effettuato tramite tamponi rettali in cani e gatti sia domestici che di canile, sani, con diarrea o che presentavano varie condizioni mediche o chirurgiche. La prevalenza media di *Campylobacter* rilevata in questo studio è stata pari al 41,5% nel cane e al 42,9% nel gatto. Si nota una prevalenza più alta nei cani di canile e nei cani affetti da diarrea. Alte percentuali però sono state riscontrate anche in animali sani e ciò suggerisce che cane e gatto possono essere portatori asintomatici di *Campylobacter*. Gli animali giovani rappresentavano la fascia d'età con maggiore positività. Le specie isolate sono state *C. upsaliensis* (65% del totale degli isolati), *C. jejuni* (22,5%), *C. coli* (3,8%) e *C. lari* (2,5%). Inoltre, solo due gatti hanno presentato positività per *C. helveticus*. In due gatti e due cani è stata ritrovata più di una specie di *Campylobacter* [Acke *et al.*, 2009].

In Svizzera Wieland *et al.* nel 2005 hanno rilevato una prevalenza di *Campylobacter* del 41,2% nei cani e del 41,9% nei gatti. Tali dati si basano su un campionamento di animali sani tramite tamponi rettali. Circa l'8% dei cani e il 6,4% dei gatti albergava due specie differenti del patogeno. Elevate prevalenze sono state osservate in animali giovani e animali che vivevano all'aperto, rispetto a quelli che vivevano in casa. Il 73,5% dei ceppi isolati è stato identificato come *C. upsaliensis* o *C. helveticus*, mentre *C. jejuni* rappresentava il 10,9% di tutti gli isolati. Da notare che *C. helveticus* era presente solo nei gatti [Wieland *et al.*, 2005].

Parsons *et al.* hanno riscontrato nel Regno Unito una prevalenza di *Campylobacter* del 38% nella popolazione canina nel 2009. Il campionamento in tale studio si è svolto su feci di cani visitati in vari ambulatori veterinari del Paese, per motivi vari e quindi su una popolazione composta da animali sani, con diarrea o con varie condizioni mediche o chirurgiche. Dei 96 campioni positivi di questo studio, in 94 è stato rilevato *C. upsaliensis* e in 3 *C. jejuni*, con un campione contenente entrambe le specie di *Campylobacter*. Anche in questa ricerca si è messa in evidenza la predisposizione dei cani più giovani ad albergare *Campylobacter* [Parsons *et al.*, 2009].

In uno studio del 2005 svolto nelle isole Barbados da Workman *et al.*, la prevalenza di *Campylobacter* era del 46,9% per i cani e del 37,3% per i gatti. Il campionamento è stato

effettuato tramite tamponi rettali in animali sia sani che con diarrea. Nel cane *C. jejuni* si è dimostrata la specie più comune (50%), seguita da *C. coli* (7,6%) e *C. upsaliensis* (4,5%) e da altre specie minori, mentre nel gatto la specie predominante era *C. helveticus* (50%) seguita da *C. upsaliensis* (30%) e da *C. jejuni* (10%). Anche in questo studio si è notata una maggior prevalenza in cani giovani (il 70% dei positivi aveva un'età inferiore all'anno) e in cani randagi o di canile (77,3% di tutti i positivi). Non è stata riscontrata alcuna correlazione fra diarrea e presenza di *Campylobacter* [Workman *et al.*, 2005].

Secondo una ricerca svolta in Canada, nella città di Saskatoon, da Chaban *et al.* nel 2010, i cani affetti da diarrea presentavano livelli di positività maggiori rispetto ai cani sani. In tale studio sono state ricercate 14 specie di *Campylobacter* tramite estrazione del DNA batterico dalle feci di cani sani e affetti da diarrea. Il DNA del patogeno è stato rilevato nel 56% delle feci dei cani sani e nel 97% di quelle dei cani con diarrea. *C. upsaliensis* è risultata la specie più comune (43% in cani sani e 85% in cani con diarrea), seguita da *C. jejuni* (7% in cani sani e 46% cani con diarrea) e da *C. showae* (6% in cani sani e 28% in cani con diarrea). *C. coli* è stato rilevato solo in feci diarroiche (25%) e così pure, anche se meno frequentemente, *C. concisus*, *C. gracilis*, *C. lari* e *C. mucosalis*. Dei cani sani, il 14% aveva una coinfezione con più specie di *Campylobacter*, mentre in quelli diarroici la percentuale si elevava al 66%. Sorprendentemente in tre cani con diarrea sono state rilevate ben 12 specie di *Campylobacter* coesistenti [Chaban *et al.*, 2010].

Nel 1991 in Cile, nella città di Valdivia, Fernández e Martin hanno svolto uno studio nel quale è stata rilevata una prevalenza di *Campylobacter* nella popolazione canina del 42,5%. I campioni sono stati raccolti con tampone rettale da cani sani, sia di proprietà sia non di proprietà. Il 51,3% dei positivi erano cani di canile [Fernández e Martin, 1991].

Una prevalenza inferiore rispetto a quelle riscontrate negli articoli sopracitati è stata rilevata da Lòpez *et al.* nel 2002 in Argentina a Buenos Aires. La prevalenza di *Campylobacter* rilevata in tale studio risulta del 17% nella popolazione canina e del 16% in quella felina. Il campionamento è stato svolto tramite tamponi rettali da cani e gatti sani e da cani con diarrea. Anche questo studio ha messo in risalto come cani giovani abbiano un tasso di positività maggiore rispetto ad animali adulti, ciò non viene però confermato per i gatti, inoltre non vengono notate associazioni fra diarrea e positività per *Campylobacter* [Lòpez *et al.*, 2002].

A sostegno della maggiore presenza del patogeno in animali giovani si può, inoltre, citare uno studio svolto da Hald *et al.* nel 2004. In tale ricerca sono stati campionati, eseguendo tamponi fecali, solo giovani esemplari di cani sani di proprietà provenienti da diverse zone della Danimarca. I campioni positivi erano il 76,2% con tassi di isolamento superiori in animali con meno di 12 mesi di vita rispetto a quelli d'età compresa fra i 12 e i 24 mesi. *C. upsaliensis* era presente nel 75% dei campioni positivi, *C. jejuni* nel 19,4%, *C. lari* nel 2,1%, *C. coli* nello 0,7%, mentre la restante parte (2,8%) degli isolati di *Campylobacter* non era stata identificata a livello di specie. In tale studio si nota bene come animali giovani siano più suscettibili al patogeno e viene messo in evidenza che i maschi potrebbero avere maggiori probabilità di contrarre l'infezione [Hald *et al.*, 2004].

A Taiwan nel 2007 Tsai *et al.* hanno riscontrato una prevalenza di *Campylobacter* del 2,7% nei cani di proprietà e del 23,8% in cani non di proprietà, esaminando tamponi rettali raccolti casualmente da cani di canile e domestici. *C. jejuni* è risultata la specie più comune (86,8%), seguita da *C. upsaliensis* (9,3%) e *C. coli* (3,9%). Dunque anche in questo studio si evidenzia come la presenza del patogeno sia più elevata in popolazioni di cani di canile piuttosto che in cani di proprietà [Tsai *et al.*, 2007].

In Italia Rossi *et al.* nel 2008 hanno svolto uno studio nel quale sono risultati positivi a *Campylobacter* 53 su 190 cani testati (27,9%) e 27 su 84 gatti testati (32,1%). Gli animali provenivano tutti dalla provincia di Bologna e comprendevano individui clinicamente sani o affetti da diarrea. Nei cani predominava *C. upsaliensis* (17,3%), seguito da *C. jejuni* (8,9%), mentre nei gatti *C. helveticus* si è rivelata la specie maggiormente isolata (16,7%), mentre *C. jejuni* e *C. upsaliensis* sono stati isolati meno frequentemente (8,3% e 7,2% rispettivamente) [Rossi *et al.*, 2008].

I dati di questi studi sulla prevalenza e sulla distribuzione di specie di *Campylobacter* in cane e gatto sono riassunti nelle tabelle sottostanti (tabella 2 e tabella 3).

Tab. 2: Prevalenza di *Campylobacter* rilevata in diversi studi.

Fonte bibliografica	Prevalenza di <i>Campylobacter</i> nella popolazione canina	Prevalenza di <i>Campylobacter</i> nella popolazione felina
Acke <i>et al.</i> , 2009	41,5%	42,9%
Wieland <i>et al.</i> , 2005	41,2%	41,9%
Parsons <i>et al.</i> , 2009	38%	non indagata
Workman <i>et al.</i> , 2005	46,9%	37,3%
Fernández e Martin 1991	42,5%	non indagata
Lòpez <i>et al.</i> , 2002	17%	16%
Hald <i>et al.</i> , 2004	76,2%	non indagata
Tsai <i>et al.</i> , 2007	2,7% se di proprietà 23,8% se non di proprietà	non indagata
Rossi <i>et al.</i> , 2008	27,9%	32,1%

Tab. 3: Frequenza di isolamento di diverse specie di *Campylobacter* in diversi studi.

Fonte bibliografica	<i>C. jejuni</i>	<i>C. upsaliensis</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. lari</i>	<i>C. helveticus</i>
Acke <i>et al.</i> , 2009	22,5%	65% totale	3,8% totale	2,5% totale	13% in gatto
Wieland <i>et al.</i> , 2005	10,9%	73,5%* con <i>C. helveticus</i>	0%	non trovato	73,5% * con <i>C. upsaliensis</i>
Parsons <i>et al.</i> , 2009	3,1%	97,9% totale	non trovato	non trovato	non trovato
Workman <i>et al.</i> , 2005	50% in cane 10% in gatto	4,5% in cane 30% in gatto	7,6% in cane	non trovato	50% in gatto
Hald <i>et al.</i> , 2004	19,4% in cane	75% in cane	0,7% in cane	2,1% in cane	non trovato
Tsai <i>et al.</i> , 2007	86,8% in cane	9,3% in cane	3,9% in cane	non trovato	non trovato
Rossi <i>et al.</i> , 2008	8,9% in cane 8,3% in gatto	17,3% in cane 7,2% in gatto	non trovato	non trovato	16,7% in gatto

* = *C. upsaliensis* e *C. helveticus* non sono stati differenziati in questo studio.

2.5 Resistenza agli antimicrobici di *Campylobacter*

Gli antimicrobici sono farmaci attivi nel trattamento delle infezioni batteriche, perché capaci di uccidere i batteri o di impedirne la moltiplicazione. L'uso degli antimicrobici ha contribuito grandemente al progresso della medicina, diminuendo la letalità delle malattie infettive batteriche e le complicanze infettive legate a traumi, ferite e interventi chirurgici. Il successo di tali farmaci, però, è stato parzialmente offuscato dalla capacità dei batteri di sviluppare resistenza alla loro azione, mediante modificazioni del loro patrimonio genetico per mutazione oppure mediante acquisizione "in blocco" di geni che conferiscono resistenza a uno o più antimicrobici da altri batteri, anche di specie diversa (trasferimento orizzontale). Il fenomeno dell'antibiotico-resistenza consiste essenzialmente in un adattamento evolutivo dei batteri nei confronti dell'uso degli antimicrobici. In un mondo che fa largo uso di tali farmaci, non solo in terapia umana, ma anche in zootecnia e in medicina veterinaria, popolazioni batteriche antibiotico-resistenti si sono rapidamente selezionate e diffuse sia in comunità che in ambito ospedaliero, rendendo problematico il trattamento antimicrobico e rendendo l'antibiotico-resistenza un problema di Sanità Pubblica di rilievo. Per il prossimo futuro non si prevedono nuove classi di antimicrobici; pertanto solo un uso più contenuto e più appropriato di questi farmaci può contrastarne la perdita di efficacia [Sack *et al.*, 2001].

Ad oggi per la terapia dei casi di campilobatteriosi, che richiedono un trattamento antimicrobico, i principi attivi di prima scelta sono macrolidi, in particolare l'eritromicina, seguiti dai fluorochinoloni, come la ciprofloxacina. In alternativa vengono utilizzate le tetracicline, mentre nei casi più gravi può essere necessaria la somministrazione endovenosa di aminoglicosidi [Moore *et al.*, 2006; Alfredson e Korolik, 2007; Luangtongkum *et al.*, 2009; Acke *et al.*, 2009b]. L'insorgenza di resistenze a tali principi attivi spesso aumenta il periodo di degenza e guarigione e in casi particolari, come nei soggetti immunocompromessi e in giovane età, può persino causare un pericolo per la vita stessa.

Come sottolinea l'Organizzazione mondiale della Sanità [Sack *et al.*, 2001] anche per *Campylobacter*, in tutto il mondo, una complessa interazione di fattori ha creato un ambiente favorevole alla rapida comparsa di antibiotico-resistenze che hanno ridotto l'efficacia di alcuni farmaci. Negli ultimi tre decenni sono stati segnalati in tutto il mondo

aumenti considerevoli di ceppi di *Campylobacter* resistenti ai fluorochinoloni, soprattutto a enrofloxacin e ciprofloxacina. Un esempio lampante potrebbe essere quello della Spagna, in cui la resistenza alla ciprofloxacina è aumentata dal 47,5% del 1991 all'88% del 1994 [Ruiz *et al.*, 1998]. Macrolidi, come eritromicina e azitromicina, continuano invece a essere piuttosto efficaci [Sack *et al.*, 2001]; è segnalato però un notevole aumento di resistenza all'eritromicina (88%) di ceppi di *C. coli* isolati da suini trattati con macrolidi [Sáenz *et al.*, 2000]. Anche la resistenza alla tetraciclina è molto aumentata e a causa di ciò tale antibiotico non è più molto usato nel trattamento delle enteriti da *Campylobacter*. Inoltre è stato osservato che la resistenza alla kanamicina è correlata alla resistenza alla tetraciclina [Sáenz *et al.*, 2000]. Una buona attività nei confronti di *Campylobacter* viene invece mantenuta da cloramfenicolo, eritromicina e gentamicina [Sack *et al.*, 2001].

Molti studi hanno dimostrato una correlazione fra l'utilizzo di agenti antimicrobici in ambito zootecnico e veterinario e l'aumento dell'antibiotico-resistenza di *Campylobacter* isolati dall'uomo, in particolare nei confronti dei fluorochinoloni. Tra questi, l'enrofloxacin è stata utilizzata molto, soprattutto negli USA, nell'allevamento dei broiler durante gli anni '90. Di conseguenza è stato registrato un aumento della prevalenza di ceppi di *Campylobacter* resistenti alla ciprofloxacina tale da mettere in discussione il ruolo dei fluorochinoloni nella terapia della campilobatteriosi umana. Al contrario in Australia, dove nessun principio attivo appartenente a questa classe di antimicrobici è registrato per l'uso nel reparto zootecnico, permane invece un'elevata sensibilità di *Campylobacter* ai fluorochinoloni [Moore *et al.*, 2006; Alfredson e Korolik, 2007; Luangtongkum *et al.*, 2009]. Inoltre, per quanto riguarda i macrolidi, è stato riportato che l'utilizzo continuo della tilosina nell'allevamento avicolo e suino comporta la selezione di ceppi resistenti all'eritromicina.

Tuttavia, importanti differenze nella dinamica di insorgenza dell'antibiotico-resistenza in *Campylobacter* sono state messe in luce per i fluorochinoloni e i macrolidi.

In alcuni casi ceppi di *Campylobacter* resistenti ai fluorochinoloni sono stati rilevati già dopo 24 ore dall'inizio del trattamento con tali farmaci. Il trattamento determina la rapida conversione di una popolazione batterica sensibile in una popolazione resistente, tramite la selezione dei ceppi che presentano le mutazioni spontanee che conferiscono resistenza ai fluorochinoloni. Una volta avvenuta la mutazione, questa viene mantenuta dal batterio anche in assenza di pressione selettiva da parte dell'antimicrobico [Luangtongkum *et al.*, 2009]. Per i macrolidi, invece, la situazione è differente: lo sviluppo della resistenza è lento e i mutanti ottenuti con una sola fase di selezione presentano una resistenza bassa o

intermedia, poiché l'acquisizione di resistenze elevate, invece, richiede tempo e un'esposizione prolungata al principio attivo, e tende a non perdurare in assenza di pressione selettiva [Luangtongkum *et al.*, 2009].

2.5.1 Antibiotico-resistenza in cane e gatto

Gli studi effettuati sull'effetto delle terapie antimicrobiche sulla selezione di ceppi batterici antibiotico-resistenti nel cane e nel gatto non sono molti e quindi non si conoscono bene, rispetto agli animali allevati in zootecnia, i livelli di resistenze raggiunti dai ceppi enterici dei *pets*. È importante sottolineare che cane e gatto sono sottoposti a ben più sporadici trattamenti antimicrobici rispetto alle frequenti e continue somministrazioni effettuate agli animali in produzione zootecnica, quindi l'insorgenza di resistenza batterica in cane e gatto è riconducibile soprattutto ad un utilizzo improprio di agenti antimicrobici da parte del medico veterinario curante.

In uno studio norvegese del 2002 è stata valutata la resistenza di *Campylobacter* isolati da cani e gatti a vari agenti antimicrobici (8) appartenenti a 6 classi. Di 22 ceppi di *C. jejuni* raccolti, solo uno (4,5%) è risultato resistente alla streptomina, mentre di 20 ceppi di *C. upsaliensis* ben 18 (90%) erano resistenti alla stessa molecola. Inoltre solo un ceppo di *C. upsaliensis* è risultato resistente all'acido nalidixico. In tale studio non sono state osservate altre resistenze [Sandberg *et al.*, 2002].

Nel 2004 in una ricerca americana è stata svolta un'indagine riguardante *Campylobacter* spp. ritrovati nel cane. Sono stati testati 4 differenti antimicrobici appartenenti ad altrettante classi e solo *C. jejuni* ha dimostrato delle resistenze. Di 11 campioni raccolti, 2 (18,2%) sono risultati resistenti alla tetraciclina ed 1 (9,1%) alla ciprofloxacina. Non sono state osservate resistenze a eritromicina e gentamicina [Lee *et al.*, 2004].

Maggiori livelli di resistenza sono stati osservati nel 2007 in uno studio svolto a Taiwan considerando ceppi di *C. jejuni*, *C. upsaliensis* e *C. coli* isolati da cani di proprietà e canile e testandoli con 16 principi attivi differenti appartenenti a 9 classi. Un'elevata percentuale dei ceppi era resistente all'azitromicina (93,9%), alla clindamicina (87,9%), all'eritromicina (81,8%) e alla tetraciclina (78,8%). La maggior parte degli stessi era resistente anche al cloramfenicolo (69,7%) e all'acido nalidixico (51,5%), mentre resistenze meno pronunciate sono state rilevate nei confronti della gentamicina (33,3% dei ceppi) e della ciprofloxacina (18,2%) [Tsai *et al.*, 2007].

Uno studio irlandese del 2009 ha rilevato discrete resistenze di ceppi di *C. jejuni* isolati da cane e gatto: acido nalidixico (37,3% dei ceppi erano resistenti), ciprofloxacina (19,6%), tetraciclina (13,7%), ampicillina (13,7%), eritromicina (11,8%) e cloramfenicolo (5,9%). In tale studio si specifica anche che il 31,4% dei campioni era resistente a due o più antimicrobici, il 9,8% era resistente a tre o più antimicrobici, il 3,9% a cinque e il 2% a sei. Mutazioni di *gyrA* codificanti per la resistenza ai fluorochinoloni sono state osservate nel 54,5% dei ceppi e il gene *tet(O)*, responsabile della resistenza alle tetracicline, è stato rilevato nel 75% dei campioni [Acke *et al.*, 2009b].

Capitolo 3 - Scopo del lavoro

La patogenicità di *Campylobacter* spp. per l'uomo è ben conosciuta, poiché questo batterio costituisce una delle principali cause, se non la più importante, delle diarree batteriche a livello mondiale [Coker *et al.*, 2002; <http://www.cdc.gov/foodnet/>]. I dati più recenti pubblicati dall'EFSA confermano tale situazione a livello europeo: 212.064 casi confermati di campilobatteriosi nell'Unione Europea nel 2010 contro i 99.020 di salmonellosi [EFSA e ECDC, 2012]. Si può ben capire quindi come le infezioni da *Campylobacter* spp. costituiscano un grave problema di salute pubblica, a livello europeo e mondiale. Per tale motivo il consiglio dell'Unione Europea ha inserito la campilobatteriosi e i relativi agenti zoonotici nell'allegato 1 della Direttiva 2003/99/CE, prevedendo una sorveglianza continua nei riguardi di tale zoonosi.

Sebbene i serbatoi principali di *Campylobacter* siano il pollame e gli animali da reddito, negli ultimi anni è stata posta sempre maggiore attenzione al ruolo degli animali da compagnia, come cane e gatto, quali *reservoir* di questi microrganismi e fonte di trasmissione all'uomo. È stato dimostrato che il passaggio del patogeno dall'animale d'affezione all'uomo è possibile [Damborg *et al.*, 2004; Wolfs *et al.*, 2001] e che i *pets*, secondo una ricerca svolta negli U.S.A., possono essere la causa di circa il 6% dei casi di campilobatteriosi umana [Saeed *et al.*, 1993]. Sono stati quindi effettuati alcuni studi per indagare la prevalenza e l'epidemiologia di *Campylobacter* in cane e gatto e la sintomatologia causata da una sua possibile presenza. I dati raccolti in tali ricerche non sono sempre in accordo fra loro, ma da tutti è emerso che vivere in una famiglia con un cane o un gatto colonizzati da *Campylobacter* costituisce un fattore di rischio per l'insorgenza di campilobatteriosi nell'uomo. Tale affermazione è spesso giustificata dall'alta prevalenza del patogeno in tali animali, spesso senza presenza di sintomatologia conclamata e dallo stretto contatto e dalla forte condivisione degli ambienti fra le persone e i propri animali domestici.

Scopo di questo studio è stato quello di rilevare in Veneto la diffusione di *Campylobacter* spp. nelle specie di animali da compagnia più comuni: *Canis lupus familiaris* e *Felis silvestris catus*. È stata posta particolare attenzione all'identificazione di specie dei microrganismi isolati, per comprendere anche la distribuzione di specie di *Campylobacter* nei cani e nei gatti esaminati. Inoltre è stata valutata la sensibilità dei ceppi isolati ad alcuni

fra i maggiori antibiotici usati in medicina veterinaria e nella terapia della campilobatteriosi umana, per valutare la diffusione del fenomeno dell'antibiotico-resistenza in *Campylobacter* di origine canina e felina.

Nel complesso, con tale studio si sono volute ricavare nuove conoscenze e utili informazioni sulla presenza e sull'antibiotico-resistenza di *Campylobacter* spp. in cani e gatti nel Veneto. Tali dati, per ora unici per questa regione, possono aiutarci a chiarire se i *pets* locali possano costituire una concreta fonte d'infezione e di antibiotico-resistenza per l'uomo e quindi un rischio per la salute pubblica.

Capitolo 4 - Materiali e Metodi

4.1 Campionamento

In un periodo di 14 mesi, da maggio 2009 a luglio 2010, sono stati esaminati 273 animali fra cani e gatti, comprendenti sia animali di proprietà sia animali a vita libera o provenienti da canili e rifugi. Più precisamente sono stati campionati 171 cani, fra i quali 100 di proprietà, 47 di canile, 3 vaganti e 21 di allevamento. I gatti testati invece risultavano in totale 102, con 52 animali di proprietà e 50 non di proprietà, dei quali 21 di rifugio e 29 di colonia. La scelta degli animali da campionare è stata del tutto casuale e non dettata da particolari stati patologici.

Il campionamento dei cani e dei gatti di proprietà è stato effettuato presso la Clinica Veterinaria dell'Università degli Studi di Padova. Gli animali campionati sono stati condotti dai proprietari nella struttura universitaria per motivi vari, dalla semplice vaccinazione a procedure cliniche e chirurgiche di natura specialistica. Prima di effettuare il campionamento è stato chiesto, per ogni animale, il permesso verbale al proprietario e al medico veterinario curante.

Per la raccolta di campioni dai cani non di proprietà, invece, solo 7 sono stati effettuati nella Clinica Veterinaria Universitaria di Padova, 4 di questi provenienti dal canile di Piove di Sacco (Piove di Sacco, Padova, Italia) e 3 vaganti. I restanti 43 animali sono stati campionati nelle stesse strutture nelle quali erano accolti, in particolare 14 cani presso il canile di S. Giuliano (Mestre, Venezia), 15 nel canile di Monselice (Monselice, Padova) e 14 nel canile di Correzzola (Correzzola, Padova). I 21 cani d'allevamento testati in questo studio provenivano invece da due allevamenti differenti: 17 da un allevamento di Fiesso d'Artico (VE) e 4 da un allevamento sito a Correzzola (PD).

I 50 gatti non di proprietà sono stati tutti campionati presso la Clinica Veterinaria dell'Università di Padova. Questi animali giungevano nella struttura per essere sottoposti a castrazione/sterilizzazione secondo un piano di controllo delle nascite fra i felini randagi. Dei 21 gatti di rifugio, 12 sono giunti da Chioggia (VE), 3 da Monselice (PD) mentre per 6 non è stato possibile ricevere informazioni circa il rifugio di appartenenza. Tra i 29 gatti di colonia, 12 arrivavano da Monselice (PD), 3 da Este (PD), 4 dalla colonia Valle S. Giorgio

(PD), mentre per 10 non è stato possibile risalire alla colonia di appartenenza. Per ogni animale di proprietà sono stati raccolti anamnesi e segnalamento, inoltre è stata effettuata una visita clinica accurata. Nel caso di cani non di proprietà, sono state chieste al responsabile le problematiche avute dagli animali nella struttura, per alcuni di questi era possibile risalire ad un'anamnesi remota, mentre per la maggior parte è stato impossibile ricevere informazioni approfondite. L'età di tali animali è stata fornita dal personale dei canili e si basava su una stima effettuata dai medici veterinari delle strutture. L'età dei gatti non di proprietà veniva comunicata dai responsabili dei rifugi o delle colonie o, quando non nota, veniva stimata al momento dai medici veterinari della Clinica Veterinaria Universitaria di Padova.

Ad ogni animale è stato eseguito un tampone rettale, subito posto nel terreno di trasporto Amies con carbone (Copan, Brescia, Italia) (figura 4.1) e portato al laboratorio all'interno di una borsa termica. I tamponi sono stati conservati a temperatura di refrigerazione fino al momento della processazione, che avveniva entro un massimo di 72 ore dal campionamento.

Fig 4.1: Tampone e terreno di trasporto Amies con carbone.



4.2 Isolamento e identificazione di *Campylobacter* spp.

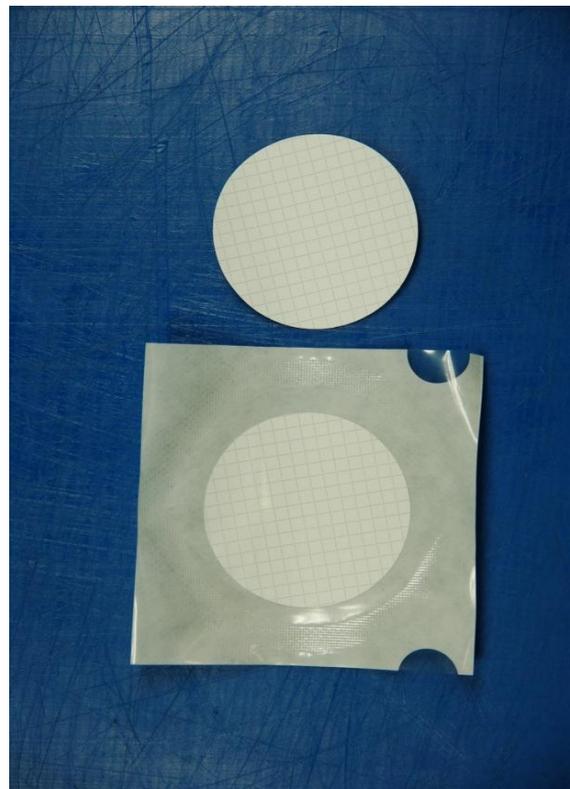
4.2.1 Isolamento

I tamponi sono stati processati per rilevare la presenza di *Campylobacter* spp. seguendo la procedura suggerita dall'OIE (2008). Ciascun campione è stato processato e quindi analizzato singolarmente. Ogni campione veniva introdotto in provette sterili contenenti 9 ml di brodo d'arricchimento selettivo Preston (1:10 w/v) (figura 4.2). Tale brodo veniva costituito utilizzando Nutrient broth n° 2 (OXOID, Basingstoke, UK), Preston *Campylobacter* Selective Supplement (OXOID), *Campylobacter* Growth Supplement (OXOID) e sangue laccato di cavallo (OXOID). Effettuata tale operazione si provvedeva ad incubare i brodi per 24 ore a 37°C in atmosfera microaerofila (10% CO₂, 5% O₂ e 85% N₂), necessaria per un'ottimale crescita di *Campylobacter* spp. La microaerofilia veniva ottenuta grazie all'utilizzo di generatori CampyGen™ (OXOID) (figura 4.5) in giare per anaerobiosi (figura 4.4).

Fig 4.2: Provetta contenente il brodo di arricchimento selettivo Preston.



Fig 4.3: Membrane filtranti.



Dopo 24 ore, il tempo necessario ad un'adeguata crescita di *Campylobacter* spp. nel brodo d'arricchimento, si procedeva con la semina di un'aliquota di ciascuna brodocoltura su due tipologie distinte di terreni solidi selettivi: Karmali agar, costituito da *Campylobacter* Agar base Karmali (OXOID) e *Campylobacter* Selective Supplement Karmali (OXOID), e CAT agar, composto da Blood-free *Campylobacter* Agar base (OXOID) e *Campylobacter* Selective Supplement CAT (OXOID). Per effettuare la semina su tali terreni è stato applicato il metodo della filtrazione passiva attraverso membrane filtranti sterili con pori del diametro di 0,45 µm (Whatman, Maidstone, UK) (figura 4.3). Nello specifico, una volta posizionata la membrana filtrante sulla superficie di ciascun terreno di coltura, si procedeva nel porvi sopra, tramite pipette sterili, un'aliquota di 150 µl del brodo d'arricchimento Preston nel quale era stato inoculato il tampone il giorno precedente. Quindi si lasciavano migrare i batteri attraverso i pori della membrana per 30 minuti a temperatura ambiente. Trascorso il tempo d'attesa, si procedeva con la rimozione della membrana filtrante tramite pinze sterilizzate su fiamma e si distribuiva il filtrato sulla piastra di coltura tramite un'ansa sterile adottando la tecnica di semina a quadranti, così da creare le condizioni ottimali per la crescita di colonie ben isolate. Effettuate queste manualità si ponevano le piastre in giare per anaerobiosi (figura 4.4), e si incubavano in microaerofilia alla temperatura di 37°C.

Dopo 48 ore di incubazione le piastre venivano esaminate per rilevare se erano cresciute colonie batteriche riconducibili a *Campylobacter* spp. di aspetto bianco-grigiastro, traslucide e di forma rotondeggiante (figura 4.6). Le piastre che non presentavano crescita batterica venivano sottoposte ad ulteriori 48 ore di incubazione. Con un'ansa sterile si prelevava una colonia dalla piastra di coltura e si riseminava su una piastra dello stesso tipo di quella di primo isolamento (Karmali o CAT agar). In alcuni casi, in particolare quando nello stesso terreno di coltura venivano riscontrate colonie dalla morfologia leggermente differente, è stata prelevata più di una colonia. Le piastre sulle quali erano state effettuate le nuove semine venivano incubate per altre 48 ore a 37°C e in microaerofilia. Lo scopo di tali semine era di ottenere colture pure da sottoporre a identificazione di genere e specie.

Fig 4.4: Due tipologie di giare per anaerobiosi.

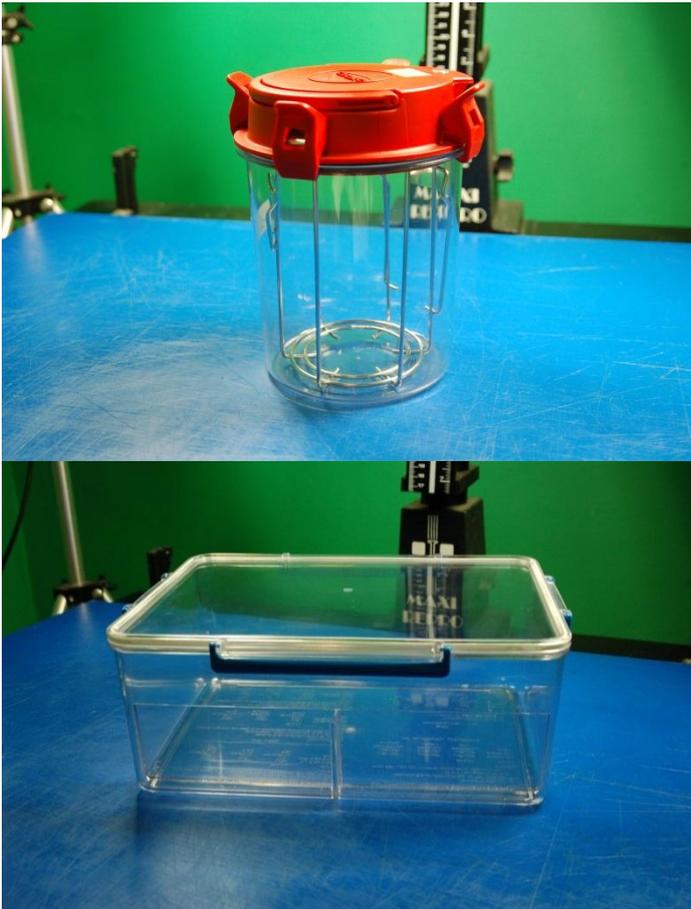


Fig 4.5: Generatore di microaerofilia CampyGen™ (OXOID).



Fig 4.6: Colonie di *Campylobacter* spp. cresciute su CAT agar.



Le colture pure così ottenute venivano ulteriormente subcoltivate in piastre di Tryptic Soy agar (OXOID) addizionato del 5% di sangue defibrinato di montone (OXOID) e incubate a 41,5°C in microaerofilia. La patina batterica cresciuta in 48 ore veniva stemperata in 1,5 ml di brodo peptone-glicerolo (25 ml glicerolo sterile, 1 g peptone, 0,5 g NaCl, 75 ml acqua distillata). Si otteneva in questo modo una soluzione ad elevata concentrazione batterica, che veniva trasferita, tramite pipette sterili, in provette *cryovial* che venivano stoccate a -80°C.

4.2.2 Identificazione

L'identificazione di genere e specie dei microrganismi isolati è stata eseguita mediante una metodica biomolecolare, più specificatamente mediante *end-point multiplex* PCR.

Per procedere alla reazione di PCR era prima necessario estrarre il DNA dei microrganismi isolati. A tale scopo si prelevava un'ansata di patina batterica cresciuta su Karmali o CAT agar e si stemperava in 500 µl di acqua distillata sterile che veniva poi sottoposta a bollitura per 20 minuti. Le provette contenenti il DNA estratto venivano conservate a -20°C fino all'esecuzione dell'identificazione di genere e specie. La reazione di PCR è stata eseguita seguendo il protocollo descritto da Yamazaki-Matsune *et al.* [2007], che permette di identificare simultaneamente il genere *Campylobacter* e le seguenti specie: *C. jejuni*, *C. coli*, *C. upsaliensis*, *C. lari*, *C. hyointestinalis* subsp. *hyointestinalis*, *C. fetus*. Per l'identificazione del genere *Campylobacter* è stata impiegata una coppia di *primer* avente come *target* una sequenza del 16S rRNA che è comune a tutte le specie di tale batterio, mentre per l'identificazione di specie sono state utilizzate coppie di *primer* specifiche per ciascuna delle specie sopra menzionate. L'elenco dei *primer*, con la relativa sequenza nucleotidica, è riportato in tabella 4. Come controlli positivi sono stati usati i seguenti ceppi: *C. coli* CIP 70.80, *C. fetus* subsp. *fetus* CIP 53.96, *C. hyointestinalis* subsp. *hyointestinalis* ATCC 35217, *C. jejuni* ATCC 33560, *C. lari* CIP 102722 e *C. upsaliensis* CIP 103681. Le reazioni di amplificazione sono state eseguite nel termociclatore automatico 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems, Monza, Italia) in un volume di reazione finale di 25 µl. Per la miscela di reazione, la concentrazione dei *primer* e la quantità di DNA analizzato sono state seguite le indicazioni di Yamazaki-Matsune *et al.* [2007]. Gli amplificati sono stati successivamente separati tramite corsa elettroforetica

in gel di agarosio al 3%, il cui risultato è stato visualizzato tramite transilluminazione ai raggi ultravioletti utilizzando lo strumento Gel DocTM XR (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

Nel caso in cui tale procedimento avesse confermato il genere *Campylobacter* spp., ma non avesse identificato nessuna delle specie sopraindicate, si procedeva alla ricerca della specie del ceppo batterico mediante sequenziamento nucleotidico di una porzione del 16S rRNA, che veniva amplificata utilizzando la stessa coppia di *primer* impiegata nella *multiplex* PCR (*primer* C412F e C1228R). Gli amplificati venivano sequenziati utilizzando il BigDye Terminator Cycle Sequencing kit v. 3.1 (Applied Biosystems) e quindi analizzati tramite lo strumento ABI 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Per l'analisi e l'assemblaggio dei cromatogrammi è stato utilizzato il *software* ChromasPro v. 1.42 (Technelysium Pty Ltd., Tewantin, Australia). Le sequenze ottenute sono state confrontate con quelle depositate nel database GenBank utilizzando il programma BLAST 2.0 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>), al fine di identificare la specie di appartenenza del ceppo di *Campylobacter* in esame.

Tab 4: *Primer* utilizzati per la *multiplex* PCR.

PRIMER	GENERE/SPECIE	SEQUENZA NUCLEOTIDICA	FONTE
C421F	<i>Campylobacter</i> spp.	5'-GGATGACACTTTTCGGAGC-3'	Linton <i>et al.</i> , 1996
C1228R	<i>Campylobacter</i> spp.	5'-CATTGTAGCACGTGTGTC-3'	Linton <i>et al.</i> , 1996
C-1	<i>C. jejuni</i>	5'-CAAATAAAGTTAGAGGTAGAATGT-3'	Wang <i>et al.</i> , 1992
C-3	<i>C. jejuni</i>	5'-CCATAAGCACTAGCTAGCTGAT-3'	Wang <i>et al.</i> , 1992
CC18F	<i>C. coli</i>	5'-GGTATGTTTCTACAAAGCGAG-3'	Linton <i>et al.</i> , 1996
CC519R	<i>C. coli</i>	5'-ATAAAGACTATCGTCGCGTG-3'	Linton <i>et al.</i> , 1996
CLF	<i>C. lari</i>	5'-TAGAGAGATAGCAAAGAGA-3'	Wang <i>et al.</i> , 1992
CLR	<i>C. lari</i>	5'-TACACATAATAATCCCACCC-3'	Wang <i>et al.</i> , 1992
CU61F	<i>C. upsaliensis</i>	5'-CGATGATGTGCAAATTGAAGC-3'	Yamazaki-Matsune <i>et al.</i> , 2007
CU146R	<i>C. upsaliensis</i>	5'-TTCTAGCCCTTGCTTGATG-3'	Yamazaki-Matsune <i>et al.</i> , 2007
HYO1F	<i>C. hyointestinalis</i> subsp. <i>hyointestinalis</i>	5'-ATAATCTAGGTGAGAATCCTAG-3'	Inglis & Kalischuk 2003
HYOFET23SR	<i>C. hyointestinalis</i> subsp. <i>hyointestinalis</i>	5'-GCTTCGCATAGCTAACAT-3'	Inglis & Kalischuk 2003
MG3F	<i>C. fetus</i>	5'-GGTAGCCGCAGCTGCTAAGAT-3'	Hum <i>et al.</i> , 1997
CF359R	<i>C. fetus</i>	5'-AGCCAGTAACGCATATTATAGTAG-3'	Yamazaki-Matsune <i>et al.</i> , 2007

4.3 Valutazione della sensibilità agli antimicrobici

Per testare la sensibilità agli antimicrobici dei ceppi di *Campylobacter* spp. isolati durante questo studio è stato utilizzato il test di diffusione in piastra di Kirby-Bauer [Bauer *et al.*, 1966]. Questo test valuta la sensibilità di un microrganismo verso numerosi antimicrobici, tramite l'applicazione di dischetti impregnati dei principi attivi in esame su un terreno solido inoculato con il microrganismo da esaminare. Come terreno di coltura per tale test abbiamo utilizzato il Mueller-Hinton agar (OXOID) con il supplemento del 5% di sangue defibrinato di montone (OXOID). È stata testata la sensibilità dei ceppi isolati verso 20 principi attivi antimicrobici appartenenti a 9 classi differenti, riportati in tabella 5.

Tab 5: Antimicrobici testati in questo studio e relativa quantità contenuta nei dischetti.

<ul style="list-style-type: none">➤ Aminoglicosidi<ul style="list-style-type: none">- Gentamicina (10 µg)- Streptomina (10 µg)➤ Cefalosporine<ul style="list-style-type: none">- Cefalotina (30 µg)- Cefotaxime (30 µg)- Ceftiofur (30 µg)➤ Penicilline<ul style="list-style-type: none">- Amoxicillina/Acido Clavulanico (30 µg)- Ampicillina (10 µg)➤ Chinoloni<ul style="list-style-type: none">- Acido Nalidixico (30 µg)- Flumequina (30 µg)- Ciprofloxacina (5 µg)- Enrofloxacin (5 µg)- Marbofloxacina (5 µg)➤ Fenicoli<ul style="list-style-type: none">- Cloramfenicolo (30 µg)➤ Sulfamidici+Diaminopirimidine<ul style="list-style-type: none">- Trimetoprim/Sulfametossazolo (25 µg)➤ Macrolidi<ul style="list-style-type: none">- Eritromicina (15 µg)- Azitromicina (15 µg)- Tilosina (30 µg)➤ Lincosamidi<ul style="list-style-type: none">- Clindamicina (2 µg)➤ Tetracicline<ul style="list-style-type: none">- Doxiciclina (30 µg)- Oxitetraciclina (30 µg)
--

Tutti i dischi di antimicrobico impiegati nella nostra ricerca erano prodotti dalla ditta OXOID, con le sole eccezioni della tilosina, ottenuta da Mast Diagnostic Ltd. (Merseyside, UK), della marbofloxacin, prodotta da A.T.I. (Ozzano Emilia, Bologna, Italia), e dell'azitromicina, distribuita da Becton Dickinson (Shannon, County Glare, Ireland). Ognuno di tali dischi era impregnato con una dose standard di antimicrobico, come riportato in tabella 5.

Per effettuare il test venivano rivitalizzati i ceppi batterici stoccati a -80°C . La procedura prevedeva di prelevare con un'ansa sterile una piccola quantità di materiale ancora congelato dalle provette *cryovial* e seminarla su piastre di Tryptic Soy agar (OXOID) addizionato del 5% di sangue defibrinato di montone (OXOID). Effettuata la semina si ponevano le piastre ad incubare in condizioni di microaerofilia per 48 ore a 37°C . Grazie a questo passaggio non solo si rivitalizzava il microrganismo, ma si otteneva anche un quantitativo di patina batterica più che sufficiente per il test dell'antibiogramma. Trascorse 48 ore dalla semina si procedeva a raccogliere, tramite un'ansa sterile, un piccolo quantitativo di patina batterica e la si stemperava in una provetta contenente 3 ml di soluzione fisiologica sterile (NaCl 0,9% w/v). Con tale procedura si doveva ottenere una torbidità della soluzione pari allo 0,5 della scala di McFarland, corrispondente a una concentrazione di $1,5 \times 10^8$ UFC/ml. Nella soluzione così ottenuta si immergeva un tampone sterile e con questo si inoculavano le piastre di Mueller-Hinton agar (OXOID) più 5% di sangue defibrinato di montone, in modo tale da garantire un'ottima semina su tutta la superficie delle piastre e permettere una crescita omogenea della patina batterica. Successivamente si disponevano sulle piastre i dischi contenenti gli antibiotici tramite un dispensatore automatico (OXOID), così da mantenere distanze costanti fra i vari dischi ed evitare possibili sovrapposizioni degli aloni e quindi possibili errate interpretazioni del test. Inoltre, grazie a tale metodica si velocizzava molto il processo di posizionamento dei dischi e quindi si riduceva il tempo di esposizione di *Campylobacter* spp. a condizioni ambientali non favorevoli alla sua sopravvivenza. A causa dell'elevato numero di principi attivi esaminati, ogni campione analizzato veniva seminato in cinque differenti piastre, sulle quali venivano posizionati i dischi antibiotati secondo uno schema da noi prefissato sulla base del diametro atteso degli aloni di inibizione (figura 4.7, 4.8, 4.9, 4.10 e 4.11).

Piastra 1

- Amoxicillina/Acido Clavulanico
- Ampicillina
- Enrofloxacin
- Clindamicina



Fig 4.7: Disposizione dei dischi antibiotati nella piastra n° 1

Piastra 2

- Eritromicina
- Streptomina
- Cefalotina
- Oxitetraciclina
- Ceftiofur



Fig 4.8: Disposizione dei dischi antibiotati nella piastra n° 2

Piastra 3

- Cefotaxime
- Flumequina
- Cloramfenicolo
- Gentamicina



Fig 4.9: Disposizione dei dischi antibiotati nella piastra n° 3

Piastra 4

- Marbofloxacin
- Tilosina
- Sulfametossazolo/Trimethoprim



Fig 4.10: Disposizione dei dischi antibiotici nella piastra n° 4

Piastra 5

- Acido Nalidixico
- Ciprofloxacina
- Doxiciclina
- Azitromicina

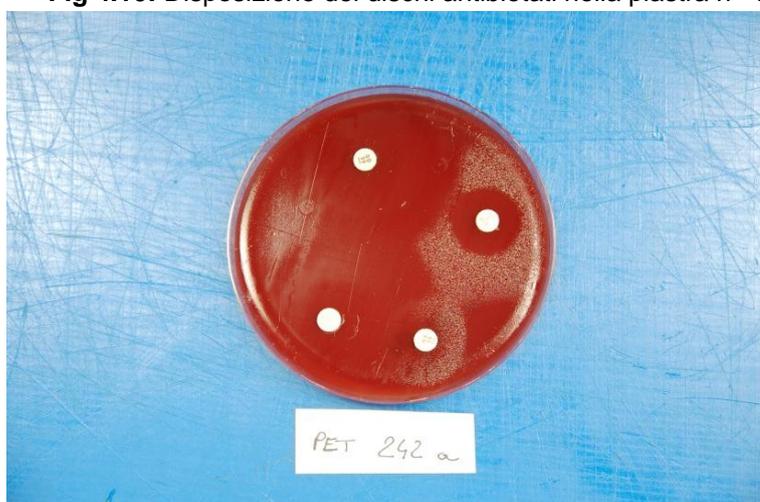


Fig 4.11: Disposizione dei dischi antibiotici nella piastra n° 5

Subito dopo il posizionamento dei dischi, le piastre venivano incubate in condizioni di microaerofilia per 24 ore a 37°C. Il giorno successivo le piastre venivano analizzate e si misuravano accuratamente i diametri degli aloni ottenuti a causa dell'azione inibitoria degli antimicrobici nei confronti della proliferazione batterica. A seconda del diametro di tali aloni il ceppo batterico analizzato veniva quindi definito sensibile, intermedio o resistente al principio attivo. I criteri per una corretta valutazione sono stati ottenuti dal *Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie* (2011), mentre i *breakpoint* per tilosina, ossitetraciclina, marbofloxacin e flumequina sono stati forniti dalle ditte produttrici. Per gli altri antimicrobici, non essendo *breakpoint* specifici per *Campylobacter* spp., si è fatto riferimento a quelli stabiliti dal *Clinical and Laboratory Standards Institute* per la famiglia delle *Enterobacteriaceae* (CLSI, 2007, 2008), come già riportato in letteratura [Luangtongkum *et al.*, 2007]. I diametri di ogni singolo alone venivano riportati

in un registro cartaceo per essere successivamente trasferiti su un supporto informatico ed analizzati con cura.

4.4 Analisi statistica dei dati

In questo studio è stata effettuata un'analisi di regressione logistica multivariata per valutare un'eventuale associazione tra la presenza di *Campylobacter* spp. negli animali e le seguenti variabili:

- Specie animale
- Sesso
- Età
- Origine degli animali
- Stagione di campionamento
- Presenza o meno di diarrea

Per quanto riguarda il sesso, gli animali sono stati categorizzati in maschi e femmine, senza distinguere tra soggetti interi e soggetti castrati. Sulla base dell'origine degli animali invece, questi sono stati suddivisi in tre categorie: "di proprietà", "non di proprietà", "di allevamento". Sono stati poi raggruppati gli animali a seconda del periodo stagionale in cui si è svolto il loro campionamento: autunno (da settembre a novembre), inverno (da dicembre a febbraio), primavera (da marzo a maggio) ed estate (da giugno ad agosto). Dopo attente riflessioni ed anche osservando metodiche di studio di altre ricerche sull'argomento, gli animali sono stati suddivisi a seconda della loro età in due macro-gruppi: animali di età inferiore o uguale ad 1 anno ed animali di età superiore ad 1 anno. Come soglia di significatività statistica è stato considerato un valore di $p < 0,05$. L'analisi statistica è stata eseguita tramite il *software* PASW Statistics v. 18.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)

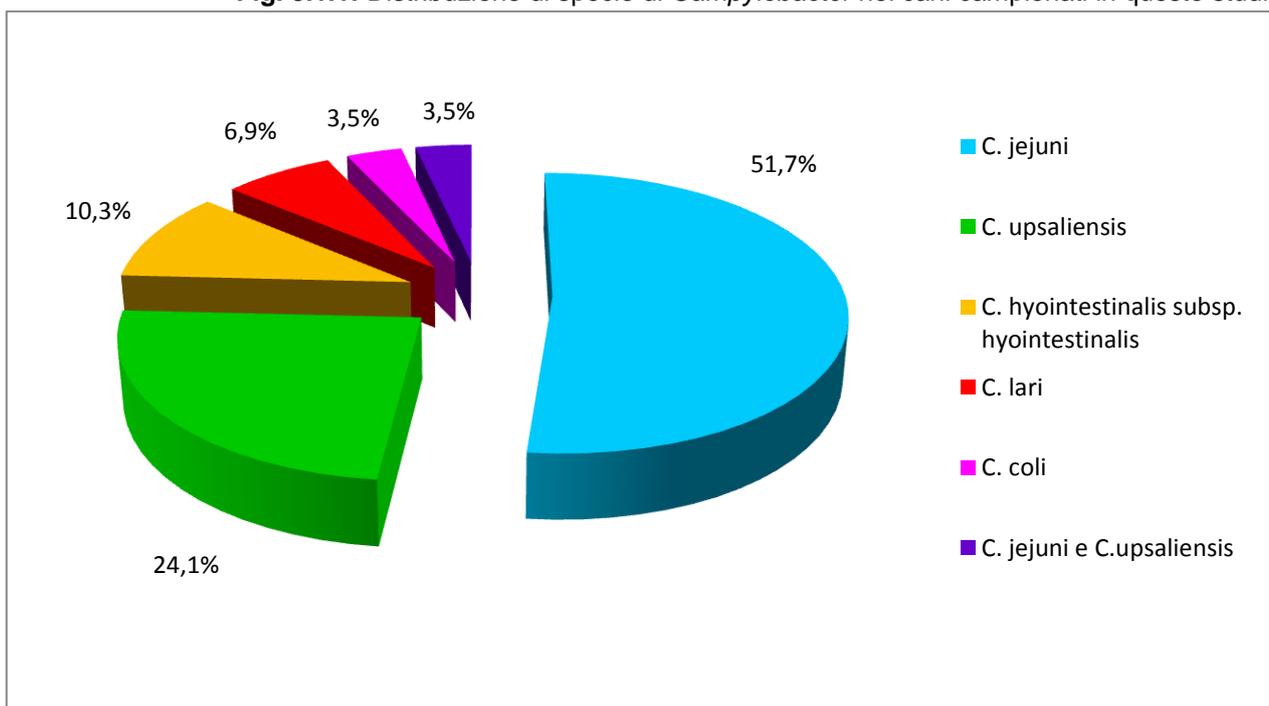
Capitolo 5 - Risultati

Come già detto nel capitolo “Materiali e Metodi”, in questo studio sono stati raccolti 273 campioni, provenienti da cani e gatti, in un periodo di circa 14 mesi. Grazie alle procedure di isolamento, 44 animali sono risultati positivi a *Campylobacter* spp. Per approfondire i risultati ottenuti si devono però considerare le due grandi categorie su cui la nostra stessa ricerca si basa, quindi discuteremo i risultati ottenuti suddividendoli in base alla specie degli animali campionati.

5.1 *Campylobacter* spp. nei cani

Il numero totale di cani esaminati è stato pari a 171 e di questi sono risultati positivi a *Campylobacter* spp. 29 animali (16,9%), con una prevalenza compresa tra 11,3% e 22,6% (95% CI). Andando ad analizzare la distribuzione di specie del microrganismo, è stata notata una maggior presenza di *C. jejuni*. Infatti, 15 animali (51,7%) erano colonizzati da *C. jejuni*, 7 (24,1%) da *C. upsaliensis*, 3 (10,3%) da *C. hyointestinalis* subsp. *hyointestinalis*, 2 (6,9%) da *C. lari*, uno (3,5%) da *C. coli* e infine in uno dei cani positivi è stata rilevata la presenza concomitante di *C. jejuni* e di *C. upsaliensis* (figura 5.1.1).

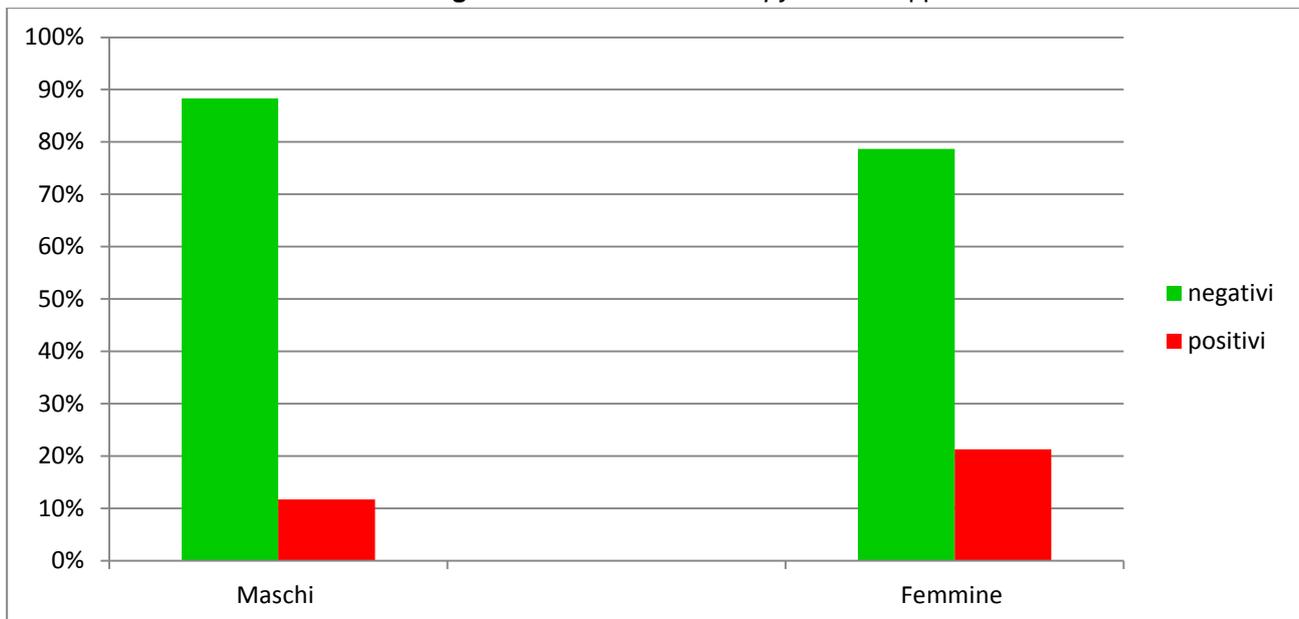
Fig. 5.1.1: Distribuzione di specie di *Campylobacter* nei cani campionati in questo studio.



5.1.1 Presenza di *Campylobacter* spp. nei cani in relazione al sesso

Dei 171 cani analizzati in questo studio, 77 erano maschi e 94 erano femmine. Nei maschi sono stati riscontrati 9 animali positivi (11,7%), mentre nelle femmine sono state riscontrate 20 positività (21,3%), come riportato in figura 5.1.2. La specie più comune nei maschi è risultata *C. jejuni* con 4 casi (44,5%), mentre *C. upsaliensis* è stato isolato da 3 animali (33,3%), *C. hyointestinalis* subsp. *hyointestinalis* è stato ritrovato in 1 solo animale (11,1%) e così pure per *C. lari*. Anche nelle femmine la colonizzazione era da attribuire più frequentemente a *C. jejuni* con 11 casi (55%), seguito da *C. upsaliensis* con 4 casi (20%), e quindi da *C. hyointestinalis* subsp. *hyointestinalis* identificato in 2 animali (10%), e da *C. lari* in un solo animale (5%), così come *C. coli*. Inoltre una cagna (5%) presentava una coinfezione da *C.jejuni* e *C. upsaliensis*.

Fig. 5.1.2: Presenza di *Campylobacter* spp. nei cani in relazione al sesso.

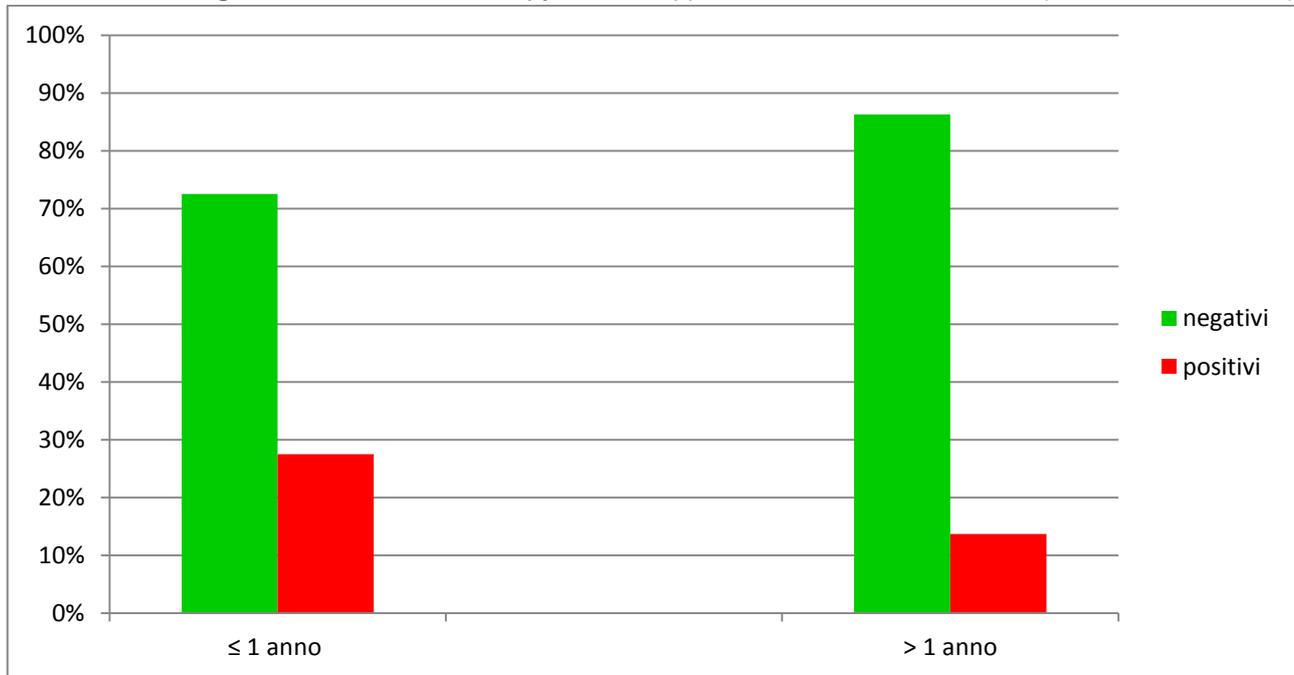


5.1.2 Presenza di *Campylobacter* spp. nei cani in relazione all'età

In totale sono stati campionati 40 esemplari di età inferiore o uguale a un anno, dei quali 11 sono risultati positivi (27,5%), mentre gli animali di età superiore ad un anno erano 131 e di questi 18 (13,7%) erano colonizzati da *Campylobacter* spp. Nella maggior parte dei cani appartenenti alla prima categoria d'età è stato rilevato *C. jejuni* (7 animali, 63,6%), seguito da *C. upsaliensis* (3 animali, 27,3%) e da un *C. lari* (1 animale, 9,1%). L'infezione da *C. jejuni* è stata la più comune anche nei cani di età superiore a un anno (8 casi, 44,4%). Degli altri cani appartenenti a questa categoria d'età, 4 (22,2%) erano colonizzati

da *C. upsaliensis*, 3 (16,7%) da *C. hyointestinalis* subsp. *hyointestinalis*, mentre nei 3 rimanenti è stato rilevato *C. lari*, *C. coli*, e una coinfezione da *C. jejuni* e *C. upsaliensis*. La diffusione di *Campylobacter* spp. nei cani esaminati in relazione all'età è riassunta in figura 5.1.3.

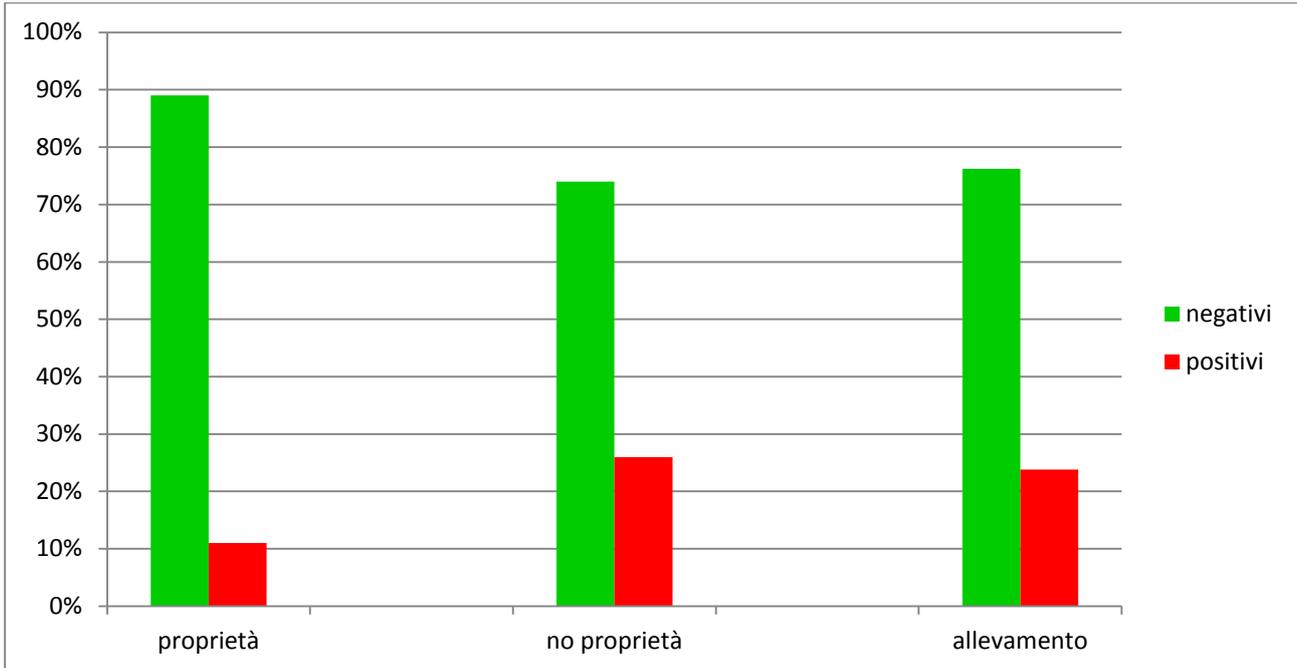
Fig. 5.1.3: Presenza di *Campylobacter* spp. nei cani in relazione all'età (≤ 1 anno e > 1 anno).



5.1.3 Presenza di *Campylobacter* spp. nei cani in relazione alla loro origine

Dei 100 cani di proprietà campionati, 11 (11%) erano colonizzati da *Campylobacter* spp., soprattutto da *C. jejuni* e *C. upsaliensis*, ciascuno dei quali colonizzava 4 (36,4%) animali, e che erano presenti entrambi in un altro caso (9,1%). I rimanenti 2 cani (18,1%) di proprietà erano colonizzati da *C. lari* e *C. coli*. Per quanto riguarda i cani non di proprietà, 50 in totale, di positivi ne sono stati trovati 13 (26%). *C. jejuni* era la specie predominante con 8 casi (61,5%), *C. hyointestinalis* subsp. *hyointestinalis* era presente in 3 animali (23,1%), mentre *C. lari* e *C. upsaliensis* sono stati riscontrati ognuno in 1 animale (7,7%). Dei 21 animali appartenenti ad allevamenti, 5 (23,8%) sono risultati positivi, 3 dei quali (60%) a *C. jejuni* e 2 (40%) a *C. upsaliensis*. L'esito dell'isolamento di *Campylobacter* spp. rispetto all'origine degli animali è illustrato in figura 5.1.4.

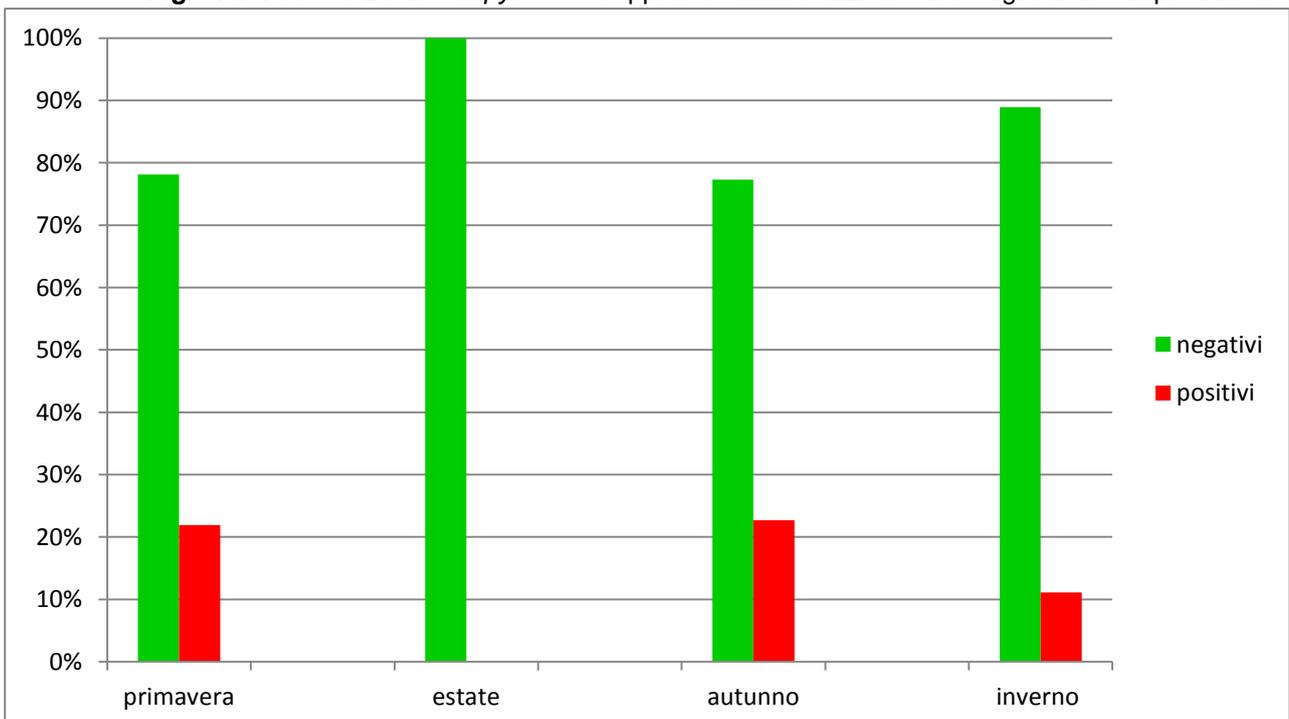
Fig. 5.1.4: Presenza di *Campylobacter* spp. nei cani in relazione alla loro origine.



5.1.4 Presenza di *Campylobacter* spp. nei cani in relazione alla stagione di campionamento

In figura 5.1.5 è riassunta la distribuzione di *Campylobacter* spp. in relazione alla stagione di campionamento.

Fig. 5.1.5: Presenza di *Campylobacter* spp. nei cani in relazione alla stagione di campionamento.

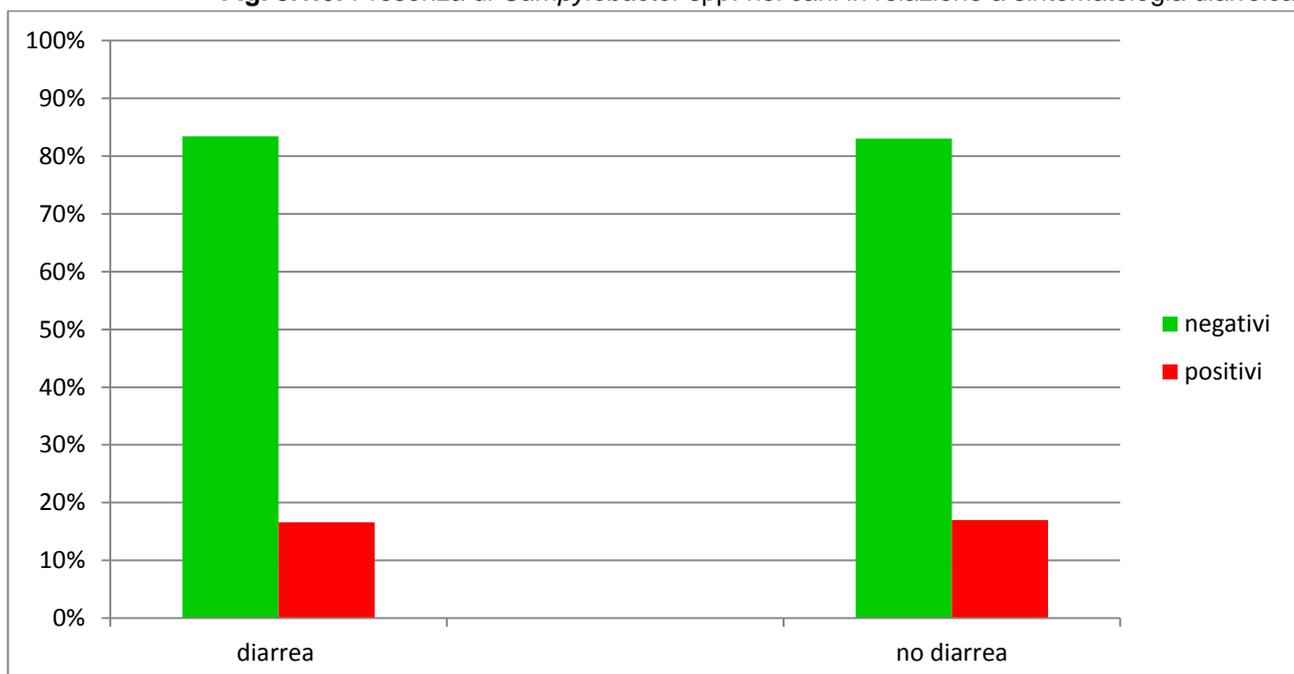


In primavera sono stati campionati 96 cani, dei quali 21 (21,9%) sono risultati positivi a *Campylobacter* spp. In quasi la metà dei casi (10 animali, 47,6%) l'infezione era sostenuta da *C. jejuni*, in 5 animali (23,8%) da *C. upsaliensis*, mentre 3 animali (14,3%) erano colonizzati da *C. hyointestinalis* subsp. *hyointestinalis*, 2 (9,5%) da *C. lari* e uno (4,8%) contemporaneamente da *C. jejuni* e *C. upsaliensis*. Durante l'estate sono stati testati 26 animali, tutti risultati negativi, mentre dei 22 cani campionati in autunno, 5 (22,7%) erano positivi, 3 dei quali (60%) a *C. jejuni* e 2 (40%) a *C. upsaliensis*. In inverno sono infine stati testati 27 animali dei quali 3 (11,1%) positivi. Di questi ultimi, 2 (66,7%) erano colonizzati da *C. jejuni* e 1 (33,3%) da *C. coli*.

5.1.5 Presenza di *Campylobacter* spp. nei cani in relazione a sintomatologia diarroica

Dei 171 cani testati, 24 (14%) presentavano diarrea evidente, mentre nei restanti 147 (86%) le feci erano normali. Dei 24 animali con sintomatologia diarroica, 4 (16,6%) sono risultati positivi a *Campylobacter* spp. (figura 5.1.6): uno (25%) a *C. upsaliensis*, uno (25%) a *C. hyointestinalis* subsp. *hyointestinalis*, uno (25%) a *C. lari* e uno (25%) contemporaneamente a *C. jejuni* e *C. upsaliensis*. Dei 147 animali esenti da diarrea, 25 (17%) erano quelli affetti da *Campylobacter* spp. (figura 5.1.6): 15 (60%) da *C. jejuni*, 6 (24%) da *C. upsaliensis*, 2 (8%) da *C. hyointestinalis* subsp. *hyointestinalis*, 1 (4%) da *C. coli* e 1 (4%) da *C. lari*.

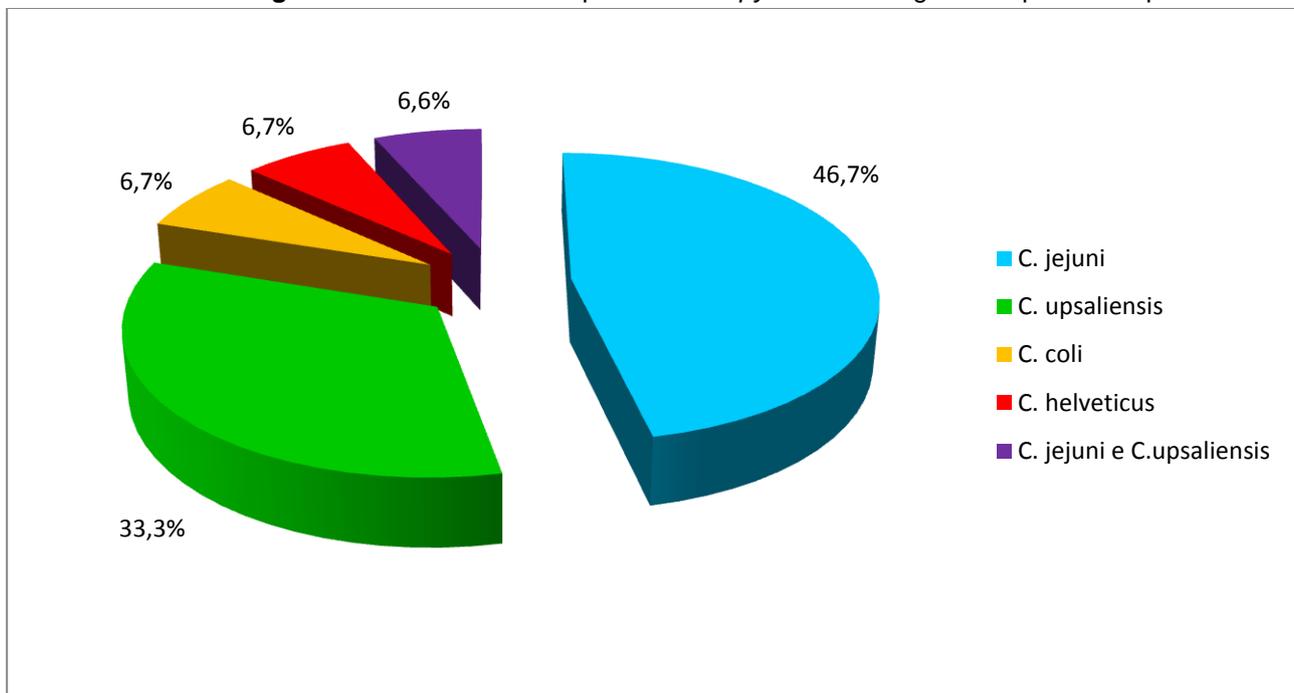
Fig. 5.1.6: Presenza di *Campylobacter* spp. nei cani in relazione a sintomatologia diarroica.



5.2 *Campylobacter* spp. nei gatti

In totale sono stati campionati 102 gatti e di questi 15 (14,7%) sono risultati positivi a *Campylobacter* spp., con una prevalenza compresa tra 7,8% e 21,6 % (95% CI). Nello specifico, 7 animali (46,7%) erano portatori di *C. jejuni* e 5 (33,3%) di *C. upsaliensis*, mentre più rara è risultata l'infezione da *C. helveticus* e *C. coli*, ciascuno dei quali era presente in un solo animale (6,7%). Infine, in un gatto è stata rilevata coinfezione da *C. jejuni* e *C. upsaliensis* (figura 5.2.1).

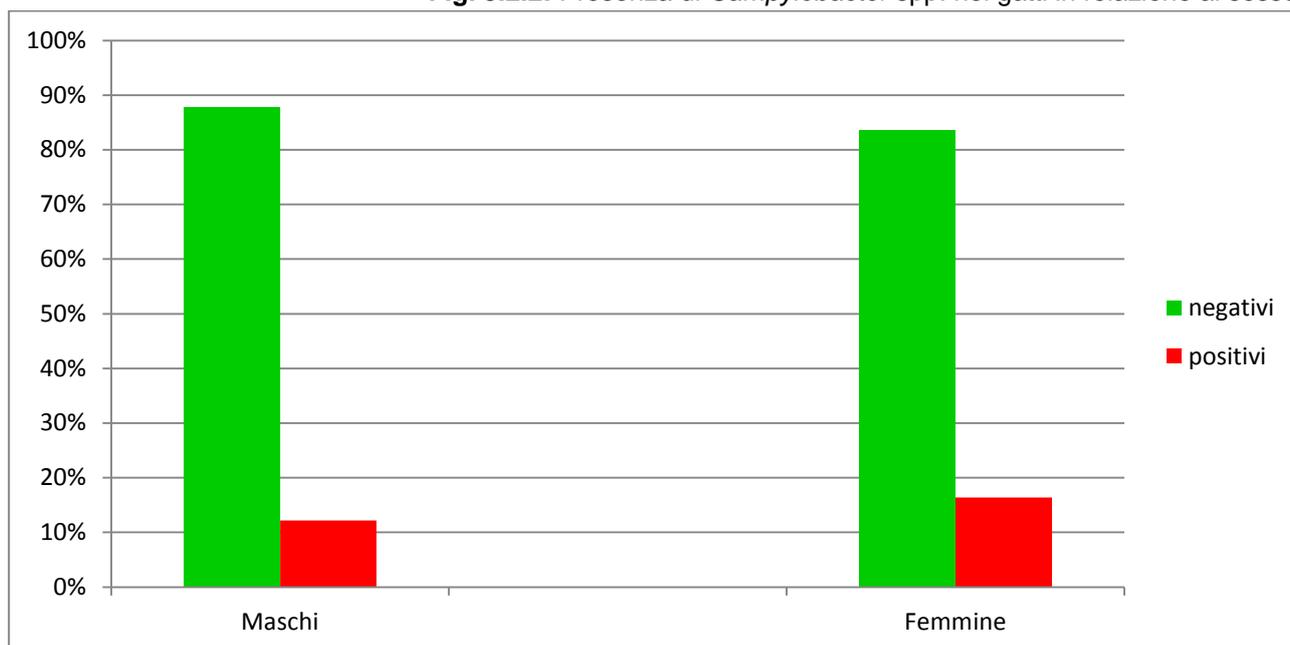
Fig. 5.2.1: Distribuzione di specie di *Campylobacter* nei gatti campionati in questo studio.



5.2.1 Presenza di *Campylobacter* spp. nei gatti in relazione al sesso

Sono stati campionati 41 maschi e 61 femmine. Nei maschi si è riscontrata positività in 5 (12,2%) animali (figura 5.2.2), 2 dei quali (40%) colonizzati da *C. jejuni* e 3 (60%) da *C. upsaliensis*. Tra le femmine, 10 (16,4%) erano colonizzate da *Campylobacter* spp. (figura 5.2.2): 5 (50%) da *C. jejuni*, 2 (20%) da *C. upsaliensis*, una (10%) da *C. helveticus*, così come una da *C. coli* ed una da *C. jejuni* e *C. upsaliensis* contemporaneamente.

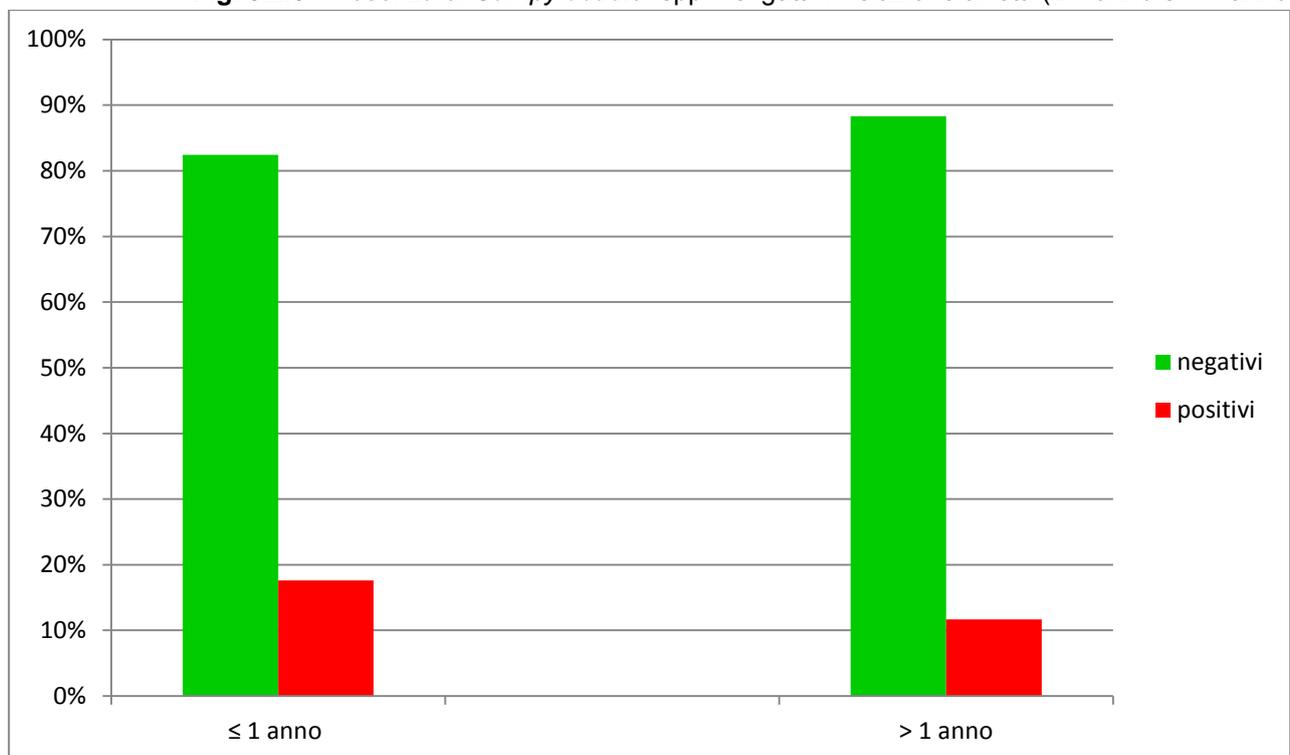
Fig. 5.2.2: Presenza di *Campylobacter* spp. nei gatti in relazione al sesso.



5.2.2 Presenza di *Campylobacter* spp. nei gatti in relazione all'età

La diffusione di *Campylobacter* spp. in relazione all'età dei gatti esaminati è illustrata in figura 5.2.3.

Fig. 5.2.3: Presenza di *Campylobacter* spp. nei gatti in relazione all'età (≤ 1 anno e > 1 anno).

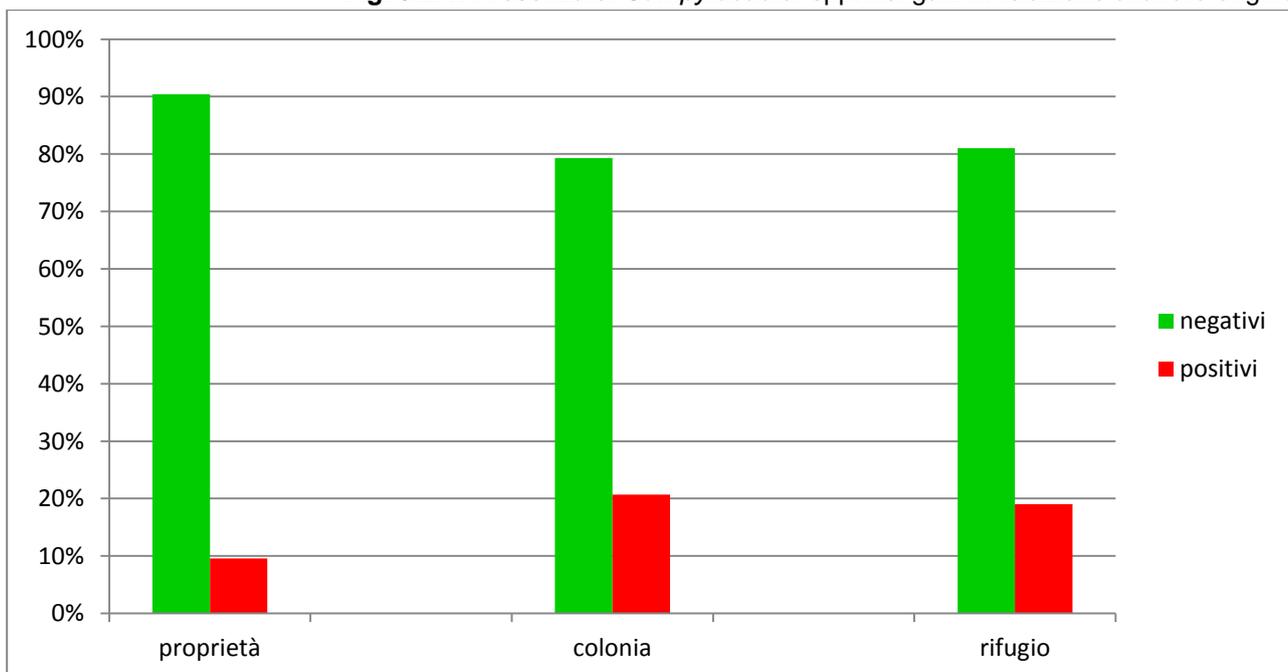


Sia per la categoria dei gatti d'età inferiore o uguale a un anno, sia per quella dei gatti di età superiore a un anno, sono stati analizzati 51 animali. L'esemplare che presentava coinfezione da *C. jejuni* e *C. upsaliensis* era di età inferiore o uguale a un anno, mentre gli altri gatti appartenenti a questa categoria presentavano infezione o da *C. jejuni* (6 animali, 66,7%) o da *C. upsaliensis* (2 animali, 22,2%), per un totale di 9 (17,6%) positivi. Nel gruppo dei gatti di età superiore a un anno sono stati riscontrati 6 (11,7%) animali positivi, *C. upsaliensis* era presente in 3 gatti (50%), mentre *C. jejuni*, *C. helveticus* e *C. coli* sono stati isolati ciascuno in 1 animale (16,7%).

5.2.3 Presenza di *Campylobacter* spp. nei gatti in relazione alla loro origine

In totale gli animali di proprietà sono risultati 52, dei quali 5 (9,6%) albergavano *Campylobacter* spp. (figura 5.2.5), più precisamente 3 (60%) *C. jejuni* e 2 (40%) *C. upsaliensis*. Complessivamente in questo studio sono stati esaminati 50 gatti non di proprietà e il microrganismo è stato riscontrato in 10 (20%) di questi. Più specificamente, i gatti di rifugio campionati erano 21 e, fra questi, 4 (19%) erano positivi (figura 5.2.5), con un animale coinfecto da *C. jejuni* e *C. upsaliensis* e infezioni singole da *C. jejuni*, *C. upsaliensis* e *C. coli*. Nei 29 soggetti di colonia è stata riscontrata la presenza del microrganismo in 6 (20,7%) casi (figura 5.2.5). *C. jejuni* è stato ritrovato in 3 (50%) animali, *C. upsaliensis* in 2 (33,3%) e *C. helveticus* in 1 (16,7%).

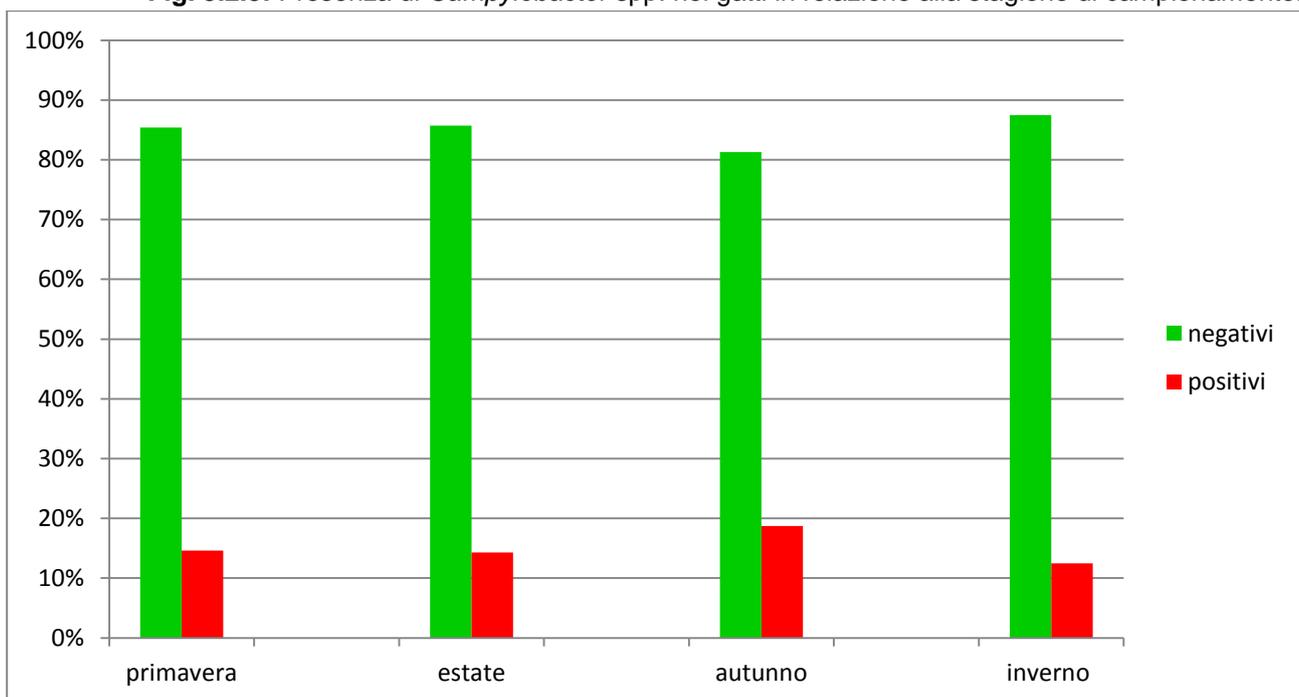
Fig. 5.2.4: Presenza di *Campylobacter* spp. nei gatti in relazione alla loro origine.



5.2.4 Presenza di *Campylobacter* spp. nei gatti in relazione alla stagione di campionamento

In primavera sono stati campionati 41 gatti e di questi 6 (14,6%) presentavano il microrganismo, in 3 casi (50%) *C. jejuni* e negli altri 3 casi (50%) *C. upsaliensis*. Durante l'estate sono stati analizzati 21 animali e 3 (14,3%) di questi erano positivi a *Campylobacter* spp.: uno (3,33%) a *C. upsaliensis*, uno a *C. coli* e uno contemporaneamente a *C. jejuni* e *C. upsaliensis*. In autunno gli animali campionati sono stati 16, con 3 (18,7%) positivi a *Campylobacter* spp., dei quali 2 (66,7%) a *C. jejuni* e 1 (33,3%) a *C. upsaliensis*. I gatti campionati in inverno sono stati 24 con positività in 3 (12,5%) individui, 2 (66,7%) a *C. jejuni* e 1 (33,3%) a *C. helveticus*. In figura 5.2.7 è riassunta la distribuzione di *Campylobacter* spp. in relazione alla stagione nella quale sono stati svolti i campionamenti.

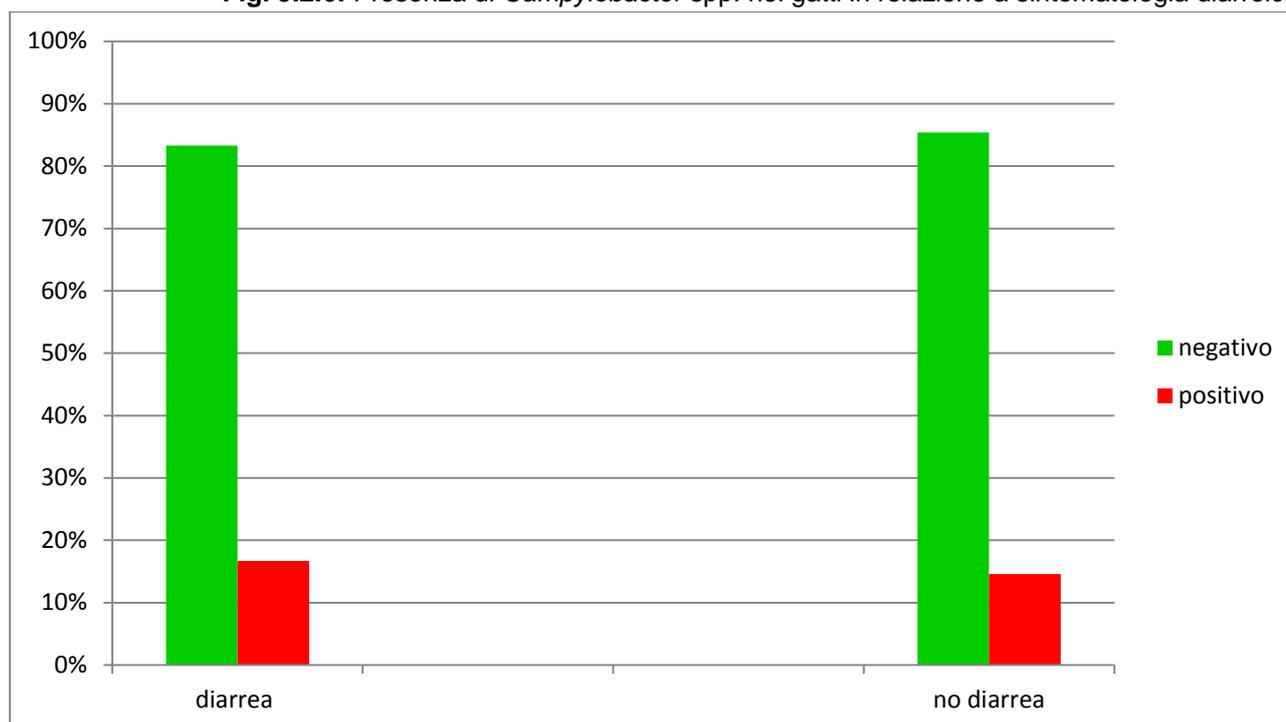
Fig. 5.2.5: Presenza di *Campylobacter* spp. nei gatti in relazione alla stagione di campionamento.



5.2.5 Presenza di *Campylobacter* spp. nei gatti in relazione a sintomatologia diarroica

Dei 102 gatti esaminati, 6 presentavano diarrea e 96 feci formate. Solo un animale diarroico era positivo (16,7%) e in particolare coinfecto da *C. jejuni* e *C. upsaliensis*. Negli animali non affetti da diarrea si sono riscontrati 14 (14,6%) soggetti positivi (figura 5.2.8): 7 (50%) a *C. jejuni*, 5 (35,8%) a *C. upsaliensis*, 1 (7,1%) a *C. helveticus* e 1 (7,1%) a *C. coli*.

Fig. 5.2.6: Presenza di *Campylobacter* spp. nei gatti in relazione a sintomatologia diarroica.



5.3 Esito dell'analisi statistica

Dall'analisi statistica svolta è risultato che l'unica variabile, fra tutte quelle analizzate, associata all'infezione da *Campylobacter* è l'origine degli animali ($p < 0,05$). In particolare, sia i cani sia i gatti non di proprietà, rispetto a quelli di proprietà, sarebbero più a rischio di venire colonizzati dal microrganismo.

5.4 Resistenza agli antimicrobici

Per il test dell'antibiogramma sono stati selezionati 46 ceppi, secondo il criterio di testare un ceppo per ciascuna specie di *Campylobacter* isolata da ciascun animale. Tuttavia di seguito sono riportati i risultati relativi a 39 ceppi, in quanto 7 ceppi batterici hanno dimostrato scarsa proliferazione, risultato che è stato rilevato anche in successive repliche del test. Pertanto, l'esito della valutazione della sensibilità agli antimicrobici di tali ceppi non è stato ritenuto attendibile ed è stato escluso dall'analisi dei dati. In totale, su 39

ceppi, 22 (56,5%) appartenevano alla specie *C. jejuni*, 11 (28,2%) a *C. upsaliensis*, 2 (5,1%) a *C. coli*, 2 (5,1%) a *C. lari* e 2 (5,1%) a *C. hyointestinalis* subsp. *hyointestinalis*.

Per una migliore visione d'insieme della diffusione del fenomeno dell'antibiotico-resistenza nei ceppi testati, i risultati sono descritti senza distinguere tra ceppi isolati dai cani e ceppi isolati dai gatti.

Gli **aminoglicosidi** testati in questa ricerca sono stati gentamicina e streptomicina. Nessuna resistenza è stata riscontrata per il primo di questi due principi attivi, mentre nel caso della streptomicina sono stati ritrovati 9 (23%) ceppi batterici resistenti e un (3%) intermedio, tutti appartenenti a *C. upsaliensis*.

Come **cefalosporine** sono state testate la cefalotina, il cefotaxime e il ceftiofur. In tutto, 28 (72%) dei 39 ceppi batterici hanno dimostrato resistenza alla cefalotina e fra questi c'erano 22 (100%) *C. jejuni*, 1 (9%) *C. upsaliensis*, 2 (100%) *C. coli*, 2 (100%) *C. lari* e un (50%) *C. hyointestinalis* subsp. *hyointestinalis*. Al cefotaxime si sono rivelati resistenti 10 (26%) ceppi batterici e 6 (15%) intermedi. Nei resistenti le specie coinvolte sono state *C. jejuni* con 5 (23%) ceppi, *C. upsaliensis* con uno (9%), *C. coli* con uno (50%), *C. lari* con 2 (100%) e *C. hyointestinalis* subsp. *hyointestinalis* con uno (50%). Tra i 6 intermedi invece c'erano 4 (18%) *C. jejuni*, un (50%) *C. coli* ed un (50%) *C. hyointestinalis* subsp. *hyointestinalis*. Per quanto riguarda il ceftiofur è stata notata resistenza in 24 (61,5%) ceppi batterici e un livello intermedio di sensibilità in 10 (25,6%) isolati. Per i resistenti la divisione in specie forniva i seguenti dati: 18 (82%) *C. jejuni*, 1 (9%) *C. upsaliensis*, 2 (100%) *C. coli*, 2 (100%) *C. lari* e 1 (50%) *C. hyointestinalis* subsp. *hyointestinalis*. Per gli intermedi invece le specie erano le seguenti, 4 (18%) *C. jejuni*, 5 (45%) *C. upsaliensis* e un (50%) *C. hyointestinalis* subsp. *hyointestinalis*.

Come rappresentanti della classe dei **chinoloni** in questa ricerca sono stati selezionati l'acido nalidixico, la flumequina, la ciprofloxacina, l'enrofloxacin e la marbofloxacina. In totale 15 (38%) ceppi batterici hanno dimostrato resistenza all'acido nalidixico e uno (3%) è risultato intermedio. Dei resistenti, 7 (32%) erano *C. jejuni*, 3 (27%) *C. upsaliensis*, un (50%) *C. coli*, 2 (100%) *C. lari* e 2 (100%) *C. hyointestinalis* subsp. *hyointestinalis*. La resistenza alla ciprofloxacina è stata riscontrata in 11 (28%) casi e inoltre un ceppo (3%) ha mostrato sensibilità intermedia a questa molecola. Più precisamente, i ceppi resistenti erano *C. jejuni* in 7 (32%) casi, *C. lari* in 2 (100%) casi, *C. upsaliensis* in un (9%) caso e *C. coli* in un (50%) caso. L'unico con sensibilità intermedia era un ceppo di *C. hyointestinalis*

subsp. *hyointestinalis* (50%). I ceppi resistenti alla flumequina sono stati 15 (38%), così suddivisi: 8 (36%) *C. jejuni*, 2 (18%) *C. upsaliensis*, 2 (100%) *C. lari*, 2 (100%) *C. hyointestinalis* subsp. *hyointestinalis* e un (50%) *C. coli*. Per quanto concerne l'enrofloxacin, è stata riscontrata resistenza in 4 (10%) ceppi e 7 (18%) hanno invece dimostrato una sensibilità intermedia. Le specie di *Campylobacter* coinvolte nella resistenza erano 3 (14%) *C. jejuni* e un (50%) *C. coli*. I ceppi intermedi, invece, erano 4 (18%) *C. jejuni*, 2 (100%) *C. lari* e un (50%) *C. hyointestinalis* subsp. *hyointestinalis*. Infine, 10 (26%) ceppi batterici erano resistenti alla marbofloxacin e uno (3%) mostrava sensibilità intermedia. I ceppi resistenti erano 7 (32%) *C. jejuni*, un (50%) *C. coli*, un (50%) *C. lari* e un (50%) *C. hyointestinalis* subsp. *hyointestinalis*. La sensibilità intermedia è stata rilevata in un ceppo di *C. lari* (50%).

Per la classe dei **fenicoli** è stato testato il cloramfenicolo, al quale non si sono registrate resistenza e solo 2 (5%) situazioni intermedie, tutte in *C. jejuni*.

Unico **lincosamide** testato è stato la clindamicina e in questo caso si sono osservati 2 (5%) ceppi resistenti e 4 (10%) intermedi. Le specie resistenti si sono rivelate *C. upsaliensis* in un (9%) caso e *C. hyointestinalis* subsp. *hyointestinalis* (50%) nell'altro.

Per valutare la sensibilità di *Campylobacter* spp. ai **macrolidi** sono state utilizzate l'eritromicina, l'azitromicina e la tilosina. Per l'eritromicina si è notato un solo caso di resistenza, ascrivibile a *C. upsaliensis*. Sensibilità intermedia invece è stata rilevata a carico di 4 (10%) campioni: 2 (9%) di *C. jejuni*, uno (50%) di *C. lari* e uno (50%) di *C. hyointestinalis* subsp. *hyointestinalis*. Un solo ceppo, appartenente alla specie *C. upsaliensis* era resistente all'azitromicina, mentre non è stata rilevata nessuna situazione intermedia. Per la tilosina, invece, le resistenze erano in tutto 4 (10%), sviluppate da un (9%) *C. upsaliensis*, 2 (100%) *C. hyointestinalis* subsp. *hyointestinalis* e un (50%) *C. lari*.

Nell'ambito delle **penicilline** sono state utilizzate l'associazione di amoxicillina e acido clavulanico e l'ampicillina. Nessuna resistenza è stata riscontrata nei confronti del primo principio attivo. Invece, 12 (31%) ceppi batterici si sono dimostrati resistenti all'ampicillina: 7 (32%) *C. jejuni*, 4 (36%) *C. upsaliensis*, un (50%) *C. hyointestinalis* subsp. *hyointestinalis*. Risultati intermedi sono stati ottenuti in 3 (8%) casi, 2 (9%) in *C. jejuni* e uno (50%) in *C. lari*.

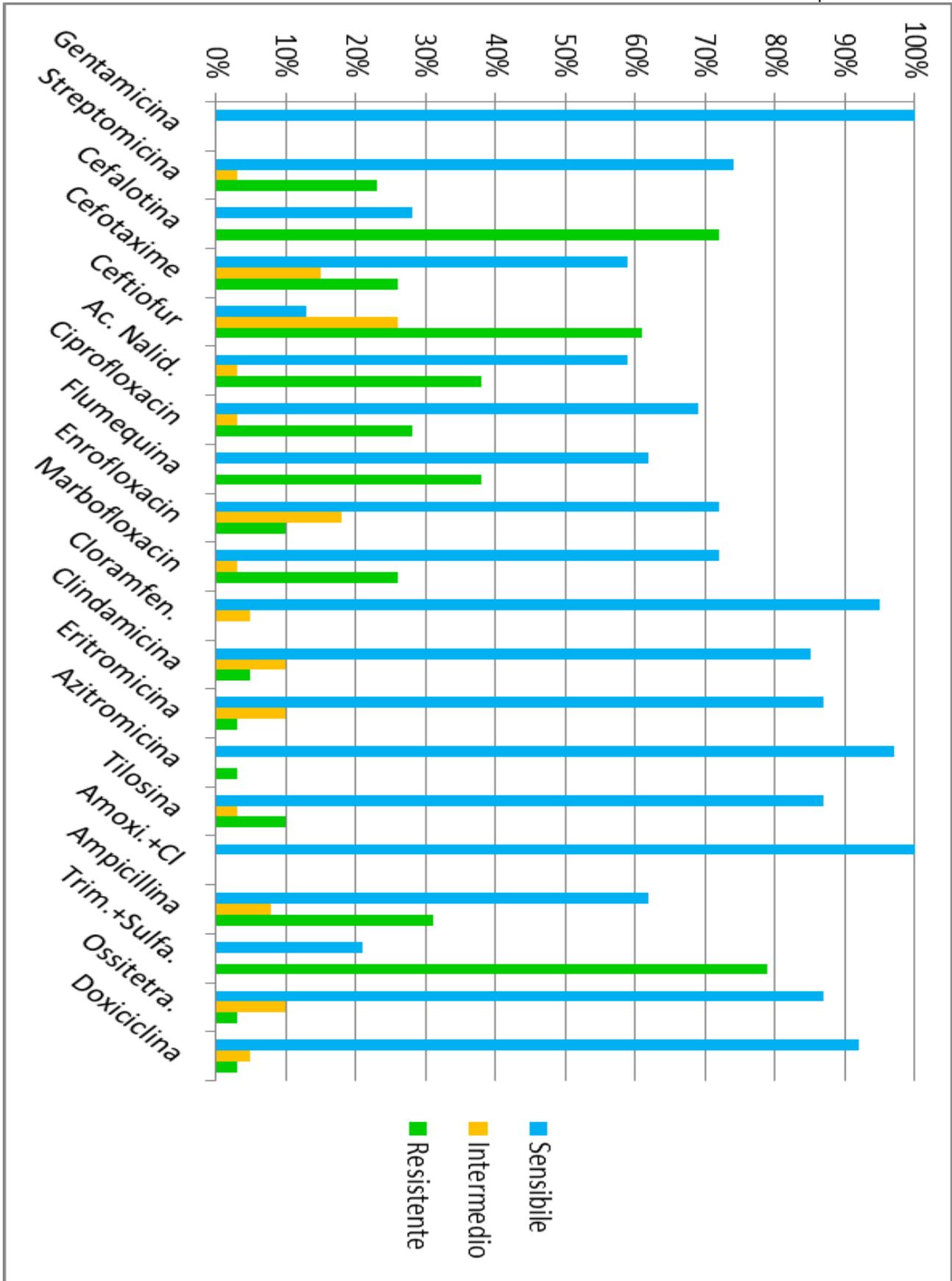
Per i **sulfamidici** è stata testata l'associazione di sulfametossazolo e trimethoprim, alla quale 31 (79%) ceppi batterici erano resistenti. Di questi, 18 (82%) erano *C. jejuni*, 8

(73%) *C. upsaliensis*, 2 (100%) *C. coli*, 2 (100%) *C. lari* e un (50%) *C. hyointestinalis* subsp. *hyointestinalis*.

Per la classe delle **tetracicline** sono state utilizzate l'ossitetraciclina e la doxiciclina. Nei confronti della prima molecola è stata riscontrata una (3%) sola resistenza (un ceppo di *C. jejuni*) e 4 ceppi (10%) intermedi, dei quali 3 (14%) erano *C. jejuni* ed un (50%) *C. coli*. Anche nei confronti della doxiciclina un solo ceppo (*C. coli*) era resistente. Gli intermedi sono stati 2 (5%), tutti appartenenti a *C. jejuni* (9%).

I risultati del test dell'antibiogramma sono riassunti nella figura 5.4.1 e nella tabella 6.

Fig. 5.4.1: Sensibilità (blu), sensibilità intermedia (giallo) e resistenza (verde) di *Campylobacter* spp. alle 20 sostanze antimicrobiche testate nel presente studio.



Tab 6: Percentuali di sensibilità e resistenza, sia delle varie specie di *Campylobacter* sia totali, riscontrate nel presente studio.

	Tetracicline			Sulfamidici			Penicilline			Macrolidi			Lincosamidi			Fenicoli			Chinoloni			Cefalosp.			Aminoglicosidi								
	Doxiciclina	Oxitetracicl.	Trim+Sulfa	Ampicillina	Amoxi+Cl	Tilosina	Azitromicina	Eritromicina	Clindamicina	Cloramfen.	Marbofloxacina	Enrofloxacin	Flumequina	Ciprofloxacina	Ac.Nalid.	Ceftiofur	Cefotaxime	Cefalotina	Streptomicina	Gentamicina	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	
<i>C. jejuni</i>	91%	82%	18%	59%	100%	100%	91%	100%	91%	68%	68%	64%	68%	68%	0%	59%	0%	100%	100%	100%	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	
	9%	14%	0%	9%	0%	0%	0%	9%	9%	0%	18%	0%	0%	0%	18%	18%	0%	0%	0%	0%	I	I	R	I	I	I	I	I	I	I	I	I	
	0%	5%	82%	32%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	32%	14%	36%	32%	32%	82%	23%	100%	0%	0%	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
<i>C. ups.</i>	100%	100%	27%	64%	100%	82%	91%	82%	100%	100%	100%	82%	91%	64%	45%	91%	91%	9%	9%	100%	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	
	0%	0%	0%	0%	0%	9%	0%	9%	0%	0%	0%	0%	0%	9%	45%	0%	0%	82%	82%	100%	I	I	R	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
	0%	0%	73%	36%	0%	9%	9%	9%	9%	0%	0%	0%	18%	27%	27%	9%	9%	0%	0%	0%	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
<i>C. coli</i>	50%	50%	0%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	50%	50%	50%	50%	50%	0%	50%	50%	100%	100%	100%	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	
	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	I	I	R	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
	50%	0%	100%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	50%	50%	50%	50%	100%	100%	100%	0%	0%	0%	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
<i>C. lari</i>	100%	100%	0%	50%	100%	50%	100%	100%	100%	100%	50%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	
	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	I	I	R	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
	0%	0%	100%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
<i>C. hyoint.</i>	100%	100%	50%	50%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	50%	100%	100%	100%	100%	100%	50%	100%	100%	100%	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	
	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	I	I	R	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
	0%	0%	50%	50%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
<i>C. spp.</i>	92%	87%	21%	62%	100%	97%	87%	85%	95%	72%	72%	62%	69%	59%	13%	59%	28%	74%	100%	100%	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	
	5%	10%	0%	8%	0%	0%	10%	10%	5%	3%	3%	0%	3%	3%	26%	15%	0%	3%	0%	0%	I	I	R	I	I	I	I	I	I	I	I	I	
	3%	3%	79%	31%	0%	3%	3%	5%	0%	0%	26%	10%	28%	38%	61%	26%	72%	23%	0%	0%	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R

5.4.1 Valutazione della multi-resistenza

E' stata infine valutata la multi-resistenza, vale a dire la resistenza a 3 o più classi di antimicrobici. Di 39 ceppi, 20 (51,3%) si sono rivelati resistenti a 3 o più delle 9 classi di antimicrobici considerate in questo studio. Ben 9 (23,1%) presentavano resistenza a 4 o più di queste classi e 2 (5,1%) a ben 5 classi di antimicrobici.

Questi risultati sono riassunti nella tabella 7.

Tab 7: Pattern di multi-resistenza a 3 classi antimicrobiche di *Campylobacter* spp. di questo studio.*

N° classi di antimicrobici	Pattern di Antibiotico resistenza	N° ceppi
3	C-F-P	1
	C-A-S	1
	C-S-T	1
	C-F-S	3
	A-P-S	1
	C-P-S	3
	F-L-M	1
4	C-F-P-S	2
	C-F-S-T	1
	A-F-P-S	1
	A-F-L-M	1
	C-F-M-S	1
	C-F-P-S	1
5	A-C-F-P-S	1
	C-F-M-P-S	1

*A = aminoglicosidi; C = cefalosporine, F = chinoloni, L = lincosamidi, M = macrolidi, P = penicilline, S = sulfamidici e T = tetracicline.

Capitolo 6 - Discussione

6.1 Presenza di *Campylobacter* spp. in cane e gatto

Alla luce di quanto finora esposto, possiamo affermare che, nel nostro studio, la prevalenza di *Campylobacter* è stata del 16,9% (95% CI = 11,3-22,6%) nel cane e del 14,7% (95% CI, 7,8-21,6%) nel gatto. Confrontando tali dati con altri studi svolti sull'argomento in Europa e nel mondo possiamo affermare che sia nel cane, sia nel gatto le prevalenze registrate sono in linea di massima simili a quelle riscontrate in uno studio svolto in Argentina [López *et al.*, 2002]. Tale lavoro è paragonabile al nostro per metodica di campionamento (tamponi rettali) e coltura batterica (proliferazione in brodo di arricchimento, filtrazione su membrana e coltura in terreno selettivo in microaerofilia). Rispetto ad altri studi, invece, la prevalenza da noi osservata si è dimostrata inferiore. Acke *et al.* [2009] hanno trovato una prevalenza di *Campylobacter* spp. in Irlanda del 41,5% nel cane e del 42,9% nel gatto. Dati molto simili sono stati riportati in Svizzera da Wieland *et al.* nel 2005 con 41,2% nei cani e 41,9% nei gatti. Nello stesso anno, nelle isole Barbados, Workman *et al.* hanno riscontrato una prevalenza di *Campylobacter* del 46,9% per i cani e del 37,3% per i gatti. In Italia Rossi *et al.* [2008] hanno descritto prevalenze di poco superiori alle nostre per il cane (27,9%) e significativamente maggiori per il gatto (32,1%). Parsons *et al.* [2009] nel Regno Unito hanno osservato una prevalenza di *Campylobacter* del 38% nella popolazione canina, mentre il 42,5% è stato trovato in Cile da Fernández e Martin [1991]. Un valore molto elevato (76,2%) è citato in una ricerca svolta in Danimarca da Hald *et al.* [2004]. A Taiwan nel 2007 Tsai *et al.* hanno riscontrato una prevalenza di *Campylobacter* inferiore alla nostra (2,7%) nei cani di proprietà, ma superiore (23,8%) in cani non di proprietà. Bisogna considerare però che queste differenze nella prevalenza riscontrate nei vari studi possono essere dovute a differenze nel metodo di campionamento, nella tipologia di animali esaminati e nei metodi di coltura dei microrganismi. Va precisato che non esiste attualmente una metodica standardizzata per l'isolamento di *Campylobacter* dagli animali, con conseguenti eterogeneità nelle procedure adottate, che potrebbero comportare anche dati di prevalenza differenti e alcune volte

scarsamente comparabili. Wieland *et al.* [2005], ad esempio, non hanno utilizzato la filtrazione su membrana ma il campione è stato inoculato direttamente sul terreno, così come nello studio di Workman *et al.* [2005], nel quale inoltre i campioni sono stati incubati in microaerofilia sino a 7 giorni. In Inghilterra, Parsons *et al.* [2009], diversamente da noi, hanno prelevato feci e omogenati fecali per l'inoculazione nei terreni di coltura. Nella ricerca svolta da Acke *et al.* [2009] la metodica d'isolamento era molto simile alla nostra, solo che anche in questo caso l'inoculazione su piastra è avvenuta senza l'interposizione di membrane filtranti. Fernandez e Martin [1991] hanno utilizzato la nostra stessa modalità di campionamento, ma terreni totalmente differenti e non hanno utilizzato membrane filtranti. Inoltre, anche altri fattori, oltre alla tipologia di campione analizzato e alla procedura di isolamento seguita, possono influire sulla frequenza di isolamento di *Campylobacter*. Ad esempio, nella ricerca di Hald *et al.* [2004] è stata rilevata una prevalenza molto elevata, ma bisogna considerare il fatto che questo studio è stato svolto su cani giovani di proprietà e non su cani adulti e/o anziani, e, come verrà approfondito in seguito, le probabilità di trovare il patogeno risultano maggiori in questa categoria. Una prevalenza lievemente superiore alla nostra è stata riscontrata anche da Rossi *et al.* [2008] in Italia; in questo studio sono stati raccolti campioni di feci fresche che sono poi stati inoculati come omogenati direttamente su piastre di terreno selettivo e mantenuti a 37° C fino a 7 giorni.

Nel nostro studio il campionamento prevedeva il prelievo di materiale fecale tramite tampone rettale. Questa metodica è stata da noi ritenuta migliore, perché consentiva il prelievo di feci sempre fresche e quindi garantiva maggiori probabilità di trovare il patogeno dove questo era presente e inoltre limitava una possibile contaminazione ambientale dovuta al contatto delle feci col suolo. Abbiamo poi deciso di utilizzare due tipi di terreni selettivi per *Campylobacter* spp., il Karmali agar ed il CAT agar, poiché l'utilizzo di differenti tipologie di terreni aumenta la sensibilità di isolamento del batterio, come viene riportato in letteratura [Patton *et al.*, 1981; Goossens *et al.*, 1983]. Di questi, il primo è un terreno selettivo, ricco di cefoperazone, utilizzato nella ricerca di *Campylobacter* spp., mentre il secondo è stato da noi scelto per le basse dosi di cefoperazone in esso contenute. Questa particolarità favorisce la crescita nel CAT agar di *C. upsaliensis*, che a differenza di altri *Campylobacter* è spesso sensibile alle cefalosporine [Acke *et al.*, 2009c]. Abbiamo infine deciso di utilizzare la tecnica delle membrane filtranti per ridurre il livello di contaminazione del terreno da parte della flora microbica contaminante, poiché quest'ultima poteva ostacolare e impedire la crescita di *Campylobacter* spp. [Steele e

McDermott, 1984]. Soprattutto in terreni come il CAT agar (meno selettivo del Karmali agar) la tecnica di filtrazione è indispensabile per una buona crescita di *Campylobacter* spp. [Goossens *et al.*, 1991].

In molte delle ricerche sopra citate sono state poi identificate le specie di *Campylobacter* spp. per meglio capire quali si ritrovano più frequentemente nel cane e nel gatto. La distribuzione delle specie di *Campylobacter* differisce molto fra i vari studi e a seconda dell'anno in cui si è svolto il lavoro. In linea di massima però si può affermare che nel cane *C. upsaliensis* [Hald *et al.*, 2004; Wieland *et al.*, 2005; Rossi *et al.*, 2008; Acke *et al.*, 2009] e *C. jejuni* [López *et al.*, 2002; Workman *et al.*, 2005; Tsai *et al.*, 2007] sono state le specie predominanti, mentre meno frequentemente in questi studi sono stati trovati *C. lari* e *C. coli*. Nel gatto sono state notate alcune differenze rispetto al cane riguardanti la distribuzione di specie di *Campylobacter*. Dalle ricerche sino ad ora condotte *C. helveticus* [Workman *et al.*, 2005; Wieland *et al.*, 2005; Rossi *et al.*, 2008] e *C. upsaliensis* [Wieland *et al.*, 2005; Acke *et al.*, 2009] sembrano essere le specie maggiormente presenti nel gatto domestico. Meno frequente nel gatto è *C. jejuni* e soltanto nel lavoro di Rossi *et al.* [2008] risulta maggiormente presente rispetto a *C. upsaliensis* pur rimanendo inferiore rispetto a *C. helveticus*. Nel nostro lavoro abbiamo rilevato una maggiore prevalenza di *C. jejuni* sia nel cane che nel gatto, seguito da *C. upsaliensis* sempre in tutte e due le specie. Per il cane i dati da noi raccolti risultano simili a quelli riscontrati in Argentina [López *et al.*, 2002], Barbados [Workman *et al.*, 2005] e Corea [Tsai *et al.*, 2007] e differenti rispetto a quelli di altri studi [Hald *et al.*, 2004; Wieland *et al.*, 2005; Rossi *et al.*, 2008; Acke *et al.*, 2009]. Nel gatto la situazione da noi osservata è differente rispetto a quella rilevata in tutti gli studi sopracitati, nei quali *C. jejuni* è sempre stato riscontrato come seconda o terza specie per frequenza. Meno comunemente abbiamo riscontrato altre specie di *Campylobacter* nel cane in ordine di frequenza decrescente abbiamo rilevato *C. hyointestinalis* subsp. *hyointestinalis*, *C. lari* e *C. coli*, mentre nel gatto abbiamo rilevato in un solo caso *C. coli* e *C. helveticus*. È rilevante sottolineare il fatto che *C. hyointestinalis* subsp. *hyointestinalis* è stato riscontrato a livello mondiale nel cane solo in un altro studio svolto in Canada [Chaban *et al.*, 2010]. Altra particolarità da noi registrata e da sottolineare è la scarsa presenza di *C. helveticus* nel gatto. Tale dato è in disaccordo rispetto a molti studi [Workman *et al.*, 2005; Wieland *et al.*, 2005; Rossi *et al.*, 2008], anche se una situazione simile è già stata osservata [Acke *et al.*, 2009a].

Un ulteriore dato interessante è la presenza simultanea di più specie di *Campylobacter* spp. nei *pets*. Nel nostro lavoro questo evento è stato verificato solo una volta sia nel cane (3,4% dei positivi), sia nel gatto (6,7% dei positivi). Tali dati risultano inferiori rispetto a quanto riportato in altre ricerche svolte nel cane da Koene *et al.* [2004] e nel gatto da Shen *et al.* [2001] o in tutte e due le specie [Acke *et al.*, 2009b].

Nel nostro studio abbiamo valutato anche il possibile effetto di numerose variabili, legate agli animali o all'ambiente, sulla prevalenza dell'infezione da *Campylobacter* nei *pets*. Un'importante variabile presa da noi in considerazione è il sesso dei cani o dei gatti campionati. In molte patologie il sesso d'appartenenza degli animali può comportare maggiori probabilità di contrarre la malattia e sembra che anche per *Campylobacter* spp. possa essere così. In uno studio svolto in Danimarca si mette in evidenza come i maschi sembrano avere più probabilità di contrarre il patogeno rispetto alle femmine [Hald *et al.*, 2004]. Tuttavia, altri studi sui *pets* [Workman *et al.*, 2005; Tsai *et al.*, 2007] non hanno trovato significative differenze tra soggetti di sesso maschile e soggetti di sesso femminile rispetto all'infezione da *Campylobacter*. Nel nostro studio le femmine, sia nel cane sia nel gatto, hanno dimostrato una maggior percentuale di positività rispetto ai maschi. Ciò suggerisce che i cani e i gatti di sesso femminile siano più frequentemente colonizzati da *Campylobacter* spp., anche se è opportuno ricordare che le differenze osservate nella positività rispetto al sesso degli animali testati non sono risultate statisticamente significative.

Abbiamo poi analizzato i risultati a seconda dell'età degli animali campionati, dividendoli in due grandi categorie: soggetti di età inferiore o uguale a un anno e soggetti di età superiore ad un anno. La scelta di creare solo questi due gruppi d'età è stata dettata dal fatto che in molte ricerche svolte in questo ambito, gli animali venivano classificati in questo modo e che le prevalenze più elevate sono segnalate in giovani al di sotto dei 12 mesi di età. Con la seguente divisione in gruppi possiamo quindi confrontare i nostri risultati con quelli di altri studi che evidenziano come *Campylobacter* spp. sia maggiormente presente in animali di età inferiore ad un anno [López *et al.*, 2002; Sandberg *et al.*, 2002; Hald *et al.*, 2004; Workman *et al.*, 2005; Wieland *et al.*, 2005; Tsai *et al.*, 2007; Acke *et al.*, 2009; Parsons *et al.*, 2009]. In molti di questi studi si ipotizza che tale fenomeno sia dovuto allo sviluppo in età adulta di una forma di immunità attiva contro il batterio e quindi ad un fenomeno di autolimitazione della presenza di *Campylobacter* spp. nei *pets*. Tuttavia, l'effetto dell'età non è sempre stato confermato nel gatto e, sulla

base dello studio di Lòpez *et al.* [2002] sembra che questa variabile non sia significativa per la presenza o meno del batterio in questa specie. I risultati del nostro lavoro sembrano in accordo con le osservazioni svolte negli studi precedenti, in quanto abbiamo osservato maggiori prevalenze negli animali di età inferiore o uguale ad un anno, più marcatamente nel cane che nel gatto, anche se dall'analisi statistica l'età non è emersa come fattore di rischio per l'infezione da *Campylobacter*.

Un altro importante argomento di discussione riguarda le specie di *Campylobacter* riscontrate nelle varie fasce d'età dei *pets*. Nel loro lavoro, Hald *et al.* [2004] hanno osservato come cani di età inferiore o uguale ad un anno mostrassero una maggiore prevalenza di *C. jejuni* rispetto a cani d'età superiore, mentre il contrario è stato osservato per *C. upsaliensis*. I dati da noi raccolti nel cane e nel gatto però non combaciano totalmente con quelli appena descritti. *C. jejuni* si è dimostrato meno frequente in tutte e due le specie in animali d'età superiore a un anno rispetto a quelli d'età inferiore o uguale a un anno, ma *C. upsaliensis* solo nel gatto era più frequente nei soggetti di età superiore ad un anno.

Inoltre abbiamo diviso gli animali in tre gruppi distinti a seconda dell'origine (animali di proprietà, animali non di proprietà e animali d'allevamento) e abbiamo osservato una maggiore prevalenza di *Campylobacter* in cani e gatti non di proprietà. In moltissimi studi è stato messo in evidenza come cani di canile o randagi siano colpiti più frequentemente da *Campylobacter* spp. rispetto ai cani di proprietà [Fernández H. e Martin R. 1991; Workman *et al.*, 2005; Tsai *et al.*, 2007; Acke *et al.*, 2009a]. Meno ricerche sono state effettuate in quest'ambito riguardo al gatto, sebbene si sospetti che l'origine non influenzi la probabilità di riscontrare il batterio in questi animali [Workman *et al.*, 2005]. L'effetto dell'origine sulla presenza di *Campylobacter* sia nei cani sia nei gatti da noi esaminati è stato confermato dall'analisi statistica, che ha identificato nell'origine degli animali l'unica variabile, tra quelle da noi considerate, significativamente associata all'infezione da *Campylobacter*. Secondo gli autori sopracitati la maggiore frequenza di *Campylobacter* nei cani di canile è dovuta ai metodi di detenzione e all'alimentazione riservata agli animali in queste strutture. Una conferma di tali ipotesi ci è giunta dall'osservazione di differenti realtà nei tre principali canili visitati durante il campionamento degli animali. Nei canili di Monselice e S. Giuliano i cani erano alloggiati in recinti e box all'aperto, spesso a contatto diretto col terreno (contaminazione ambientale) e con animali che potevano trasmettergli direttamente il patogeno (volatili selvatici e roditori). Inoltre l'alimentazione era costituita da avanzi di cibo

donati da privati alle strutture e spesso servito all'aperto, non nelle migliori condizioni igienico/sanitarie. In questi due canili la prevalenza del patogeno è stata del 28,6% a S. Giuliano e 53,3% a Monselice. Il canile di Correzzola invece presentava una realtà differente dalle due appena citate. Gli animali erano alloggiati in box e recinti all'interno di una struttura chiusa, con pavimentazione in cemento e rimozione giornaliera delle deiezioni. Non erano a contatto con uccelli selvatici o roditori e venivano nutriti con cibo secco per cani. In questo caso da nessuno dei 14 soggetti testati abbiamo isolato *Campylobacter* spp. Tuttavia, nell'illustrare queste osservazioni, è necessario ricordare che, all'analisi statistica, tutti i cani non di proprietà sono stati considerati nello stesso gruppo, senza distinguere il canile di provenienza. I cani d'allevamento invece sono stati classificati a parte poiché si distinguono sia dai cani di proprietà, soprattutto per quanto riguarda l'ambiente di vita e la coabitazione con un numero elevato di conspecifici, sia dai cani senza proprietario (di canile) per tipologia di stabulazione, tipologia di alimentazione, cure sanitarie e non solo (es. toelettatura). Nel nostro studio *Campylobacter* spp. era meno presente nei cani d'allevamento rispetto a quelli di canile, ma più frequente rispetto a quanto riscontrato nei cani di proprietà. Ciò può essere spiegato dal fatto che in allevamento c'è un'elevata concentrazione di animali e questa condizione può comportare maggior passaggio dell'infezione da animale ad animale rispetto alle comuni realtà domestiche. Per quanto riguarda i gatti, benché per l'analisi statistica per motivi di numerosità dei campioni, soggetti di rifugio e di colonia siano stati considerati come facenti parte della stessa categoria (animali non di proprietà), può essere interessante osservare la distribuzione di *Campylobacter* nei gatti di rifugio rispetto a quelli di colonia. Infatti, le condizioni di detenzione, l'alimentazione e le cure prestate agli animali in caso di bisogno sono differenti nelle due realtà. Non si sono notate elevate differenze fra questi due gruppi, sebbene i gatti di colonia siano stati lievemente più colpiti dei gatti di rifugio. In nessun altro lavoro i gatti randagi sono stati classificati in questo modo, e quindi non ci sono informazioni circa un'eventuale diversa distribuzione di *Campylobacter* spp. tra gatti di colonia e di rifugio.

Anche la stagione in cui si è svolto il campionamento è stata da noi valutata quale fattore che potesse influire sulla presenza di *Campylobacter* nel cane e nel gatto. Nell'uomo, infatti, la prevalenza di *Campylobacter* spp. varia al mutare delle stagioni, con picchi maggiori registrati in estate e in autunno [EFSA e ECDC, 2011, 2012] e sembra che questa stagionalità si verifichi anche nel cane e nel gatto. In Norvegia, nei cani il patogeno è stato riscontrato più frequentemente a maggio-giugno e a luglio-settembre [Sandberg et

al., 2002]. In Argentina si è rilevata nei cani una maggior prevalenza di *Campylobacter* spp. in estate e in autunno, mentre nei gatti soprattutto in autunno [Lòpez *et al.*, 2002]. In Svizzera invece non sono state notate differenze di rilievo nella prevalenza di *C. jejuni* da una stagione all'altra, ma nel gatto sono state osservate maggiori prevalenze di *C. upsaliensis* o *C. helveticus* in primavera ed estate [Wieland *et al.*, 2005]. Diversamente, nessuna importante variazione stagionale nella presenza del batterio è stata rilevata in studi svolti in Danimarca e Norvegia nel cane [Hald *et al.*, 2004] o nel gatto [Sandberg *et al.*, 2002]. Stando ai dati raccolti nel nostro lavoro, la primavera e l'autunno sembrano essere le stagioni di maggior prevalenza del patogeno nel cane, mentre nel gatto le stagioni nelle quali è stata rilevata la maggiore prevalenza sono primavera, estate e autunno, ma le differenze nella prevalenza di *Campylobacter* spp. a seconda della stagione di campionamento non erano elevate.

L'ultima variabile che è stata valutata è anche quella rispetto alla quale i dati scientifici mondiali sono in maggior disaccordo e cioè la presenza o meno negli animali infetti di una sintomatologia di natura diarroica. Con questa indagine volevamo osservare se la presenza di *Campylobacter* spp. a livello intestinale fosse associata ad una concomitante sintomatologia diarroica, come già riportato [Acke *et al.*, 2009]. In questo studio si spiega come *Campylobacter* fosse prevalente in cani con diarrea, rispetto a cani sani. Tuttavia, non si riusciva a comprendere se fosse *Campylobacter* a creare la sintomatologia o altre cause, spesso presenti in questi animali. In altri studi, invece, non è stata trovata alcuna associazione fra l'insorgenza di diarree e la presenza del patogeno [Lòpez *et al.*, 2002; Sandberg *et al.*, 2002; Workman *et al.*, 2005; Rossi *et al.*, 2008; Parsons *et al.*, 2009]. Wieland *et al.* [2005], invece, sostengono che i cani affetti da diarrea hanno minor probabilità di albergare il microrganismo, perché spesso sottoposti ad un trattamento antimicrobico, oppure perché il batterio viene eliminato dal tratto intestinale da un "wash-out effect" causato dalla stessa diarrea. Nel nostro studio, l'infezione da *Campylobacter* spp. è stata più frequentemente osservata nei cani e nei gatti asintomatici rispetto a quelli con sintomatologia diarroica, anche se questo dato non è risultato statisticamente significativo.

6.2 Antibiotico-resistenza di *Campylobacter* spp. in cane e gatto

Negli ultimi anni si è notato un aumento di *Campylobacter* spp. resistenti alle principali classi antimicrobiche utilizzate nella terapia umana della campilobatteriosi. La causa è spesso dovuta a una complessa interazione di vari fattori e uno dei principali è l'uso di tali molecole come promotori della crescita in zootecnia. Resistenze ai fluorochinoloni sono elevate in tutti i Paesi in cui tali farmaci vengono o sono stati somministrati al pollame e ai suini [Sack *et al.*, 2001; Moore *et al.*, 2006; Alfredson e Korolik 2007; Luangtongkum *et al.*, 2009], mentre resistenze ai macrolidi sono spesso osservate in ceppi batterici isolati da suini a cui viene somministrata tilosina con la dieta [Sáenz *et al.*, 2000]. Queste resistenze hanno un importante significato perché possono causare il fallimento delle procedure terapeutiche in caso di campilobatteriosi nell'uomo.

In tale ambito le informazioni riguardanti le resistenze agli antimicrobici di *Campylobacter* spp. nei *pets* sono ancora poche e molto frammentarie. Nel 2002 in Norvegia sono state riscontrate in cane e gatto resistenze alla streptomina in minima parte per *C. jejuni* e molto elevate per *C. upsaliensis*, il quale ha dimostrato anche una certa resistenza all'acido nalidixico [Sandberg *et al.*, 2002]. Nel 2004 in America è stata rilevata nel cane, per *C. jejuni*, resistenza alla tetraciclina e alla ciprofloxacina [Lee *et al.*, 2004]. Maggiori resistenze sono state osservate in studi più recenti: a Taiwan nel 2007 i ceppi batterici ritrovati in cani di proprietà e randagi hanno dimostrato resistenze a ben 8 dei 15 principi attivi testati. Più della metà di questi *Campylobacter* spp. non risentivano dell'azione dell'azitromicina, dell'eritromicina, della clindamicina, della tetraciclina, del cloramfenicolo e dell'acido nalidixico. Elevate resistenze sono state registrate anche nei confronti della gentamicina e dell'acido nalidixico [Tsai *et al.*, 2007]. Gli stessi principi attivi risultavano inefficaci in ceppi di *C. jejuni* in Irlanda nel 2009, anche se gli isolati resistenti erano numericamente inferiori rispetto a quelli di Tsai *et al.* [2007]. I batteri presi in esame dimostravano resistenze per l'acido nalidixico, la ciprofloxacina, la tetraciclina, l'ampicillina, l'eritromicina e il cloramfenicolo [Acke *et al.*, 2009b].

Nel nostro studio, per indagare la resistenza ai principi attivi ad azione antimicrobica dei ceppi isolati e quindi valutare la loro potenziale pericolosità per la salute pubblica, abbiamo effettuato il test dell'antibiogramma utilizzando dischi impregnati di molecole scelte tra

quelle impiegate frequentemente nella terapia dei nostri animali domestici e quelle importanti per la terapia della campilobatteriosi umana. Resistenze sviluppate dal batterio nel cane e nel gatto possono, infatti, andare a compromettere possibili trattamenti farmacologici della campilobatteriosi nell'uomo. Abbiamo valutato il *trend* di resistenza dei ceppi e successivamente abbiamo osservato possibili differenze nella resistenza fra le specie di *Campylobacter*, anche se quest'ultimo aspetto non è stato inserito nello studio statistico a causa dell'esigua numerosità dei ceppi di ogni singola specie.

La gentamicina e l'amoxicillina associata all'acido clavulanico si sono sempre rivelate efficaci verso i ceppi di *Campylobacter* spp. da noi testati. Per quanto riguarda la gentamicina, i risultati concordano con le ricerche svolte in Norvegia [Sandberg *et al.*, 2002] e America [Lee *et al.*, 2004], ma sono in disaccordo con dati provenienti da Taiwan, dove è stata trovata una resistenza alla molecola del 33,3% [Tsai *et al.*, 2007]. In quest'ultimo studio, però, i dati riguardanti l'amoxicillina associata all'acido clavulanico concordano con i nostri. Scarsa resistenza è stata da noi riscontrata per la streptomina (23% del totale) e i dati concordano con quelli norvegesi [Sandberg *et al.* 2002], indicando maggiori resistenze in *C. upsaliensis* rispetto a *C. jejuni*. La resistenza all'ampicillina da noi osservata (31% del totale) è un dato interessante, poiché solo in Irlanda sono stati segnalati ceppi di *Campylobacter* isolati da animali da compagnia resistenti a questa molecola, e in percentuale inferiore rispetto al nostro studio [Acke *et al.*, 2009b]. Per il cloramfenicolo abbiamo registrato solo pochi casi di sensibilità intermedia e tutti in *C. jejuni*. Situazioni differenti sono, invece, riportate da Tsai *et al.* [2007], con molti ceppi resistenti (69,7%) e da Acke *et al.* [2009] con riscontri inferiori (5,9%), mentre Sandberg *et al.* [2002] non hanno identificato alcuna resistenza al cloramfenicolo. Riguardo alla clindamicina, differenze sostanziali sono osservabili fra i risultati da noi conseguiti e quelli provenienti da Taiwan [Tsai *et al.*, 2007]. Infatti, le scarse resistenze mostrate dai nostri ceppi sono in netto contrasto con quelle (87,9%) riportate in questo lavoro. Situazione opposta è quella del sulfametossazolo associato al trimethoprim: dai nostri dati risultano elevate resistenze (79%), non riportate nello studio di Tsai *et al.* [2007]. Per quanto riguarda la tetraciclina, percentuali di resistenza modeste sono state descritte in Irlanda e in America [Acke *et al.*, 2009b; Lee *et al.*, 2004], elevate in Corea [Tsai *et al.*, 2007], ma nulle in Norvegia [Sandberg *et al.*, 2002]. Scarse sono state le resistenze dimostrate nei confronti della doxiciclina e dell'ossitetraciclina dai ceppi testati nel nostro lavoro. Solitamente *Campylobacter* mostra un'elevata resistenza alle cefalosporine [Alfredson e Korolik, 2007; Luangtongkum *et al.*, 2009], tanto che alcuni principi attivi appartenenti a

questa classe di antimicrobici costituiscono i supplementi selettivi nei terreni specifici per tale batterio, anche se è stata riportata una sensibilità del 2-25% [Modolo *et al.*, 2003]. Nel nostro studio abbiamo notato un'elevata percentuale di ceppi resistenti alle cefalosporine in tutte le specie tranne che in *C. upsaliensis*, che ha dimostrato elevate sensibilità alla cefalotina (91% dei ceppi), al cefotaxime (91%) e al ceftiofur (45%), e tale esito suggerisce una particolare sensibilità di tale specie alle cefalosporine e quindi conferma quanto già riportato in letteratura [Acke *et al.*, 2009c].

In molti studi viene sottolineato come le resistenze ai chinoloni si verificano, in *Campylobacter* spp., velocemente e come queste costituiscano un grave problema di salute pubblica tanto da mettere persino in discussione la validità della terapia con tali molecole. Sempre in questi studi si sottolinea come ceppi batterici animali che dimostrano resistenza all'enrofloxacin abbiano sviluppato resistenza pure per la ciprofloxacina (usata principalmente nell'uomo) [Moore *et al.*, 2006; Alfredson e Korolik, 2007; Luangtongkum *et al.*, 2009]. Negli anni, diversi studi hanno registrato percentuali crescenti di resistenza a quest'ultima molecola: 9,1% nel 2002 [Sandberg *et al.*, 2002], 18,2% nel 2007 [Tsai *et al.*, 2007] e 19,6% nel 2009 [Acke *et al.*, 2009b] ed, in linea con questo *trend*, nel nostro studio abbiamo riscontrato resistenza alla ciprofloxacina nel 28% dei ceppi. Resistenze da moderate a considerevoli sono state da noi notate nei confronti di enrofloxacin (10%), marbofloxacina (26%) e flumequina (38%). L'acido nalidixico era inefficace verso il 38% dei ceppi testati e tale dato è molto simile a quello riscontrato in Irlanda nel 2009 [Acke *et al.*, 2009b], ma inferiore a quello riportato a Taiwan nel 2007 [Tsai *et al.*, 2007]. Come per i fluorochinoloni, anche l'aumento della resistenza di *Campylobacter* spp. ai macrolidi impensierisce molto il mondo scientifico, poiché questi sono i farmaci di prima scelta nel trattamento delle campilobatteriosi umane. Resistenze all'eritromicina moderate (11,8%) sono state riscontrate in Irlanda [Acke *et al.*, 2009b] ed elevate (81,8%) in Corea [Tsai *et al.*, 2007], studio nel quale è stata riscontrata anche un'elevata resistenza all'azitromicina (93,9%). Al contrario, nel nostro studio abbiamo riscontrato elevata sensibilità ai macrolidi, con solo il 10% dei ceppi resistenti alla tilosina e il 3% sia all'azitromicina, sia all'eritromicina.

È importante sottolineare come più della metà dei nostri ceppi batterici mostrassero multi-resistenza, e, in particolare, alcuni mostravano resistenze simultanee a due delle maggiori classi di antimicrobici utilizzati nella terapia umana della campilobatteriosi. Infatti, in 3 dei 20 casi di multi-resistenza è stata riscontrata resistenza sincrona a fluorochinoloni e

macrolidi, in 2 (10%) a fluorochinoloni e aminoglicosidi, mentre un ceppo era resistente sia agli aminoglicosidi, sia ai macrolidi ed un altro ceppo era resistente sia ai fluorochinoloni, sia alle tetracicline. Queste molecole sono quelle utilizzate nella terapia della campilobatteriosi umana e la presenza di ceppi multi-resistenti a tali farmaci può costituire un grave problema dal punto di vista terapeutico. L'infezione causata da uno di questi batteri, a seguito di trasmissione dagli animali da compagnia all'uomo, potrebbe non rispondere alla terapia antimicrobica, aggravando e cronicizzando i sintomi, soprattutto quelli diarroici [Smith *et al.*, 1999; Nelson *et al.*, 2004; Engberg *et al.*, 2004; Helms *et al.*, 2005] e causando gravi rischi per la salute del paziente ed anche possibili ripercussioni a lungo termine (sindrome di Guillain-Barré o di Reiter).

Capitolo 7 - Conclusione

Da molti studi risulta evidente l'elevata responsabilità di *Campylobacter* spp. nell'insorgenza di gastroenteriti umane e altre patologie (setticemie, sindrome di Reiter, sindrome di Gullaine Barré, ecc.). Come già accennato in precedenza, il batterio è presente a livello ambientale (acqua, terreno), in moltissime tipologie di cibi, a livello intestinale negli animali domestici e non, soprattutto in pollo e suino, meno frequentemente in ovini, caprini, cane e gatto. Il contatto diretto tra l'uomo e il pollame o altri animali può comportare quindi l'instaurarsi di un'infezione da *Campylobacter* spp. nell'uomo.

I primi ritrovamenti di *Campylobacter* spp. in percentuali significative di cani e gatti hanno reso necessario approfondire le ricerche in tale ambito al fine di stabilire con maggior precisione la prevalenza dell'infezione, le specie del patogeno che vi albergavano e le eventuali resistenze antimicrobiche sviluppate, al fine di conoscere e sottoporre a controllo un possibile problema di salute pubblica. Gli studi scientifici fino ad oggi effettuati dimostrano che nel cane e nel gatto vi sono prevalenze di *Campylobacter* spp. sufficienti a sviluppare il passaggio dal *pet* all'uomo di specie patogene come *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari* e *C. upsaliensis*.

Nel nostro lavoro ci eravamo prefissati di verificare se la situazione in Italia, più specificatamente nel Veneto, fosse simile a quella segnalata in altri paesi e le nostre aspettative non sono state deluse. La nostra ricerca, infatti, ha evidenziato che il cane e il gatto sono soggetti alla colonizzazione a livello intestinale da parte di *Campylobacter* spp. Rispetto ad altri studi precedenti, la presenza che si è riscontrata è simile o inferiore, suggerendo che i *pets* possono essere fonte di infezione per l'uomo. Tale assunto trova forza nel fatto che la specie riscontrata in percentuale maggiore, sia nel cane sia nel gatto, è *C. jejuni*, il quale è stato riconosciuto, fra tutti i *Campylobacter* spp., come il maggior responsabile di gastroenteriti batteriche nell'uomo in Europa [EFSA e ECDC, 2011, 2012] e nel mondo [Coker *et al.*, 2002; <http://www.cdc.gov/foodnet/>]. Anche il ritrovamento nei *pets* di altri patogeni umani riconosciuti, come *C. coli*, *C. lari* e *C. upsaliensis* conferma quanto detto finora. L'analisi da noi effettuata ha dimostrato che l'origine del cane o del gatto è l'unico fattore statisticamente determinante la maggiore o minore presenza del batterio in questi animali. L'acquisto di animali da allevamenti o l'adozione da rifugi e canili

aumenta, quindi, il rischio per la persona di contrarre *Campylobacter* spp. dal proprio animale. Altre varianti da noi osservate come età (animali giovani) e stagionalità (primavera, estate, autunno), pur statisticamente non significative, potrebbero indicare un possibile aumento della presenza di *Campylobacter* spp. in cane e gatto, come sottolineato in altri lavori.

Dal punto di vista della salute pubblica è importante stabilire la resistenza agli antimicrobici; nel caso della nostra ricerca, sono stati evidenziati in misura moderata ceppi batterici resistenti ai fluorochinoloni, anche se in percentuale maggiore di quelli riscontrati in studi precedenti. Scarso effetto su questi patogeni sembrano avere le cefalosporine e il sulfametossazolo associato al trimethoprim. Altri principi attivi invece tendono ad avere efficacia verso tali batteri; tra questi si evidenziano i macrolidi, le tetracicline, la gentamicina, l'amoxicillina associata all'acido clavulanico e il cloramfenicolo. Preoccupa la presenza di numerosi ceppi (51,3% di quelli testati) multi-resistenti a 3 o più classi di sostanze antimicrobiche. Queste multi-resistenze possono causare nell'uomo infezioni che non rispondono al trattamento antibiotico e i cui sintomi si aggravano e hanno durata maggiore nel tempo, comportando elevati rischi per la persona e maggiori costi per i servizi sanitari [Smith *et al.*, 1999; Nelson *et al.*, 2004; Engberg *et al.*, 2004; Helms *et al.*, 2005].

Nel caso degli animali domestici sarebbe importante prevenire la possibile trasmissione del patogeno dall'animale all'uomo attuando buone norme di igiene personale dopo il contatto con il cane o il gatto, facendo osservare tali norme soprattutto ai bambini, considerati categoria a rischio. E' importante anche una buona igiene del cane o del gatto e dell'ambiente in cui esso vive, per ridurre al minimo le possibilità di contaminazione ambientale. Inoltre deve essere posta accurata attenzione per evitare che vi siano fenomeni di *cross-contamination* tra animale domestico-cibo-uomo. Queste semplici regole vanno osservate scrupolosamente soprattutto nel caso di introduzione di nuovi animali nell'ambiente familiare, poiché *Campylobacter* spp. spesso non causa sintomatologia diarroica evidente, e l'apparente stato di buona salute dell'animale può far abbassare i livelli di attenzione igienica del proprietario.

Concludendo possiamo affermare che il nostro lavoro conferma e rinforza quanto già osservato in precedenti studi: i cani e i gatti possono essere potenziali fonti di campilobatteriosi umana.

Alla luce di quanto è stato finora esposto risulta importante nel prossimo futuro approfondire la ricerca della presenza di *Campylobacter* spp. nel cane e nel gatto, ampliando - se possibile - l'ambito di campionamento all'intero territorio nazionale. Infine, per sopperire a esigenze di Salute Pubblica, visto l'esiguo quantitativo di dati reperibili in letteratura, risulta fondamentale testare il fenomeno della resistenza agli antimicrobici nei ceppi provenienti dagli animali da compagnia.

E' nostro auspicio personale che il presente lavoro sia ampliato e proseguito nel prossimo futuro.

Bibliografia

1. Acke E, McGill K, Golden O, Jones BR, Fanning S, Whyte P. 2009a. Prevalence of thermophilic *Campylobacter* species in household cats and dogs in Ireland. *Vet Rec.* 164(2):44-7.
2. Acke E, McGill K, Quinn T, Jones BR, Fanning S, Whyte P. 2009b. Antimicrobial resistance profiles and mechanisms of resistance in *Campylobacter jejuni* isolates from pets. *Foodborne Pathog Dis.* 6(6):705-10.
3. Acke E, McGill K, Golden O, Jones BR, Fanning S, Whyte P. 2009c. A comparison of different culture methods for the recovery of *Campylobacter* species from pets. *Zoonoses Public Health.* 56(9-10):490-5.
4. Alary, M, and Nadeau D. 1990. An outbreak of *Campylobacter* enteritis A associated with a community water supply. *Can. J. Public Health* 81:268–271.
5. Alfredson DA, Korolik V. 2007. Antibiotic resistance and resistance mechanisms in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* *FEMS Microbiol Lett.*;277(2):123-32.
6. Babakhani FK, Bradley GA and Joens LA. 1993. Newborn piglet model for campylobacteriosis. *Infect. Immun.* 61: 3466-3475.
7. Bauer AW, Kirby WMM, JC Sherris and M Turck. 1966. Antibiotic Susceptibility Testing by a Standardized Single Disk Method. *American Journal of Clinical Pathology* 45:493-496
8. Black RE, Levine MM, Clements ML, Hughes TP and Blaser MJ. 1988. Experimental *Campylobacter jejuni* infection in humans. *J. Infect. Dis.* 157: 472-479.
9. Bolton FJ, D Coates, PM Hinchliffe and L Robertson. 1983. Comparison of selective media for isolation of *Campylobacter jejuni/coli*. *J. Clin. Pathol.* 36:78–83.
10. Bolton FJ, Holt AV, Hutchinson DN. 1985. Urease-positive thermophilic *campylobacters*, *Lancet* 1 1217–1218.
11. Centers for Disease Control and Prevention. 2002. Outbreak of *Campylobacter jejuni* infections associated with drinking unpasteurized milk procured through a cow-leasing program—Wisconsin, 2001. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 28:548–549.
12. Chaban B, Ngeleka M, Hill JE. 2010. Detection and quantification of 14 *Campylobacter* species in pet dogs reveals an increase inspecies richness in feces of diarrheic animals. *BMC Microbiol.* 10;10:73.
13. Coker AO, Isokpehi RD, Thomas BN, Amisu KO, Obi CL. 2002. Human campylobacteriosis in developing countries. *Emerg Infect Dis.*8(3):237-44.
14. Damborg P, Olsen KEP, Nielsen EM et al. 2004. Occurrence of *Campylobacter jejuni* in pets living with human patients infected with C. jejuni. *Journal of Clinical Microbiology* 42, 1363–4.
15. Debruyne L, Gevers D, Vandamme P. 2008. Taxonomy of the Family *Campylobacteraceae*. In: Nachamkin I, Szymanski CM, Blaser MJ (Eds.), *Campylobacter*. ASM Press, Washington, DC, USA, pp. 3-26.
16. DIRETTIVA 2003/99/CE DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO del 17 novembre 2003 sulle misure di sorveglianza delle zoonosi e degli agenti zoonotici, recante modifica della

decisione 90/424/CEE del Consiglio e che abroga la direttiva 92/117/CEE del Consiglio. Gazzetta ufficiale dell'Unione europea L 325 del 12/12/2003 pag. 0031 - 0040.

17. Engberg J, Neimann J, Nielsen EM, Aarestrup FM, Fussing V, 2004. Quinolone-resistant *Campylobacter* infections: risk factors and clinical consequences. *Emerg. Infect. Dis.* 10 1056e1063.
18. European Food Safety Authority, 2011. Scientific Opinion on *Campylobacter* in broiler meat production: control options and performance objectives and/or targets at different stages of the food chain. *The EFSA Journal*, 9:2105.
19. European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control. 2011 The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2009. *The EFSA Journal*. 9(3):2090.
20. European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control. 2012 The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2010. *The EFSA Journal*. 10(3):2597
21. European Food Safety Authority. 2005. *Campylobacter* in animals and foodstuffs; Opinion of the Scientific Panel on Biological Hazards on the request from the Commission related to *Campylobacter* in animals and foodstuffs. *The EFSA Journal* 173:1-10.
22. Everest PH, Goossens H, Butzler JP, Lloyd D, Knutton S, Ketley JM and Williams PH. 1992. Differentiated Caco-2 cells as a model for enteric invasion by *Campylobacter jejuni* and *C. coli*. *J Med Microbiol* 37: 319-325.
23. Fernández H, Martin R. 1991. *Campylobacter* intestinal carriage among stray and pet dogs. *Rev Saude Publica*. 25(6):473-5.
24. Fitzgerald C, Whichard J, Nachamkin I. 2008. Diagnosis and Antimicrobial Susceptibility of *Campylobacter* species. In: Nachamkin I., Szymanski C.M., Blaser M.J. (Eds.), *Campylobacter*. ASM Press, Washington, DC, USA, pp. 227-243.
25. Fox JG, AM Hering, JI Ackerman and NS Taylor. 1983. The pet hamster as a potential reservoir of human campylobacteriosis. *J. Infect. Dis.*147:784.
26. Goossens H, L Vlaes, and J-P Butzler. 1991. *Campylobacter upsaliensis* enteritis associated with canine infections. *Lancet* 337:1486–1487.
27. Hald B, Pedersen K, Waino M, Jorgensen JC, Madsen M. 2004. Longitudinal study of the excretion patterns of thermophilic *Campylobacter* spp. in young pet dogs in Denmark. *J Clin Microbiol*, 42(5):2003-2012.
28. Harvey S and JR Greenwood. 1985. Isolation of *Campylobacter fetus* from a pet turtle. *J. Clin. Microbiol.* 21:260–261.
29. Hazeleger WC, Wouters JA, Rombouts FM and Abee T. 1998. Physiological activity of *Campylobacter jejuni* far below the minimal growth temperature. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 3917-3922.
30. Helms M, Simonsen J, Olsen KE, Mølbak K. 2005. Adverse health events associated with antimicrobial drug resistance in *Campylobacter* species: a registry-based cohort study. *J. Infect. Dis.* 191: 1050e1055.

31. Horrocks SM, Anderson RC, Nisbet DJ, Ricke SC. 2009. Incidence and ecology of *Campylobacter jejuni* and *coli* in animals. *Anaerobe*, 15:18-25.
32. Hugdahl MB, Beery JT and Doyle MP. 1988. Chemotactic behavior of *Campylobacter jejuni*. *Infect. Immun.* 56: 1560-1566.
33. Humphrey T, O'Brien S, Madsen M. 2007. *Campylobacters* as zoonotic pathogens: a food production perspective. *Int. J. Food Microbiol.*, 117:237-257
34. Jin S, Joe A, Lynett J, Hani EK, Sherman P and Chan VL. 2001. JlpA, a novel surface-exposed lipoprotein specific to *Campylobacter jejuni*, mediates adherence to host epithelial cells. *Mol. Microbiol.* 39: 1225-1236.
35. King EO. 1957. Human infections with *Vibrio fetus* and a closely related vibrio. *Journal of Infectious Diseases*, 101,119.
36. Koene MGJ, Houwers DJ, Dijkstra JR, Duim B and Wagenaar JA. 2004; Simultaneous Presence of Multiple *Campylobacter* Species in Dogs. *Journal of Clinical Microbiology* p. 819–821
37. Konkel ME, Garvis SG, Tipton SL, Anderson DE Jr. and Cieplak W. Jr. 1997. Identification and molecular cloning of a gene encoding a fibronectin-binding protein (CadF) from *Campylobacter jejuni*. *Mol. Microbiol.* 24: 953-963.
38. Lee MK, Billington SJ, and Joens LA. 2004. Potential virulence and antimicrobial susceptibility of *Campylobacter jejuni* isolates from food and companion animals. *Foodborne Pathog Dis*;1:223–230.
39. López CM, Giacoboni G, Agostini A, Cornero FJ, Tellechea DM, Trinidad JJ. 2002. Thermotolerant *Campylobacters* in domestic animals in a defined population in Buenos Aires, Argentina. *Prev Vet Med.* 15;55(3):193-200.
40. Luangtongkum T, Jeon B, Han J, Plummer P, Logue CM, Zhang Q. 2009. Antibiotic resistance in *Campylobacter*: emergence, transmission and persistence. *Future Microbiol.* 4(2):189-200.
41. Luangtongkum T, Morishita TY, El-Tayeb AB, Ison AJ, Zhang Q. 2007. Comparison of antimicrobial susceptibility testing of *Campylobacter* spp. by the agar dilution and the agar disk diffusion methods. *J Clin Microbiol.* 45(2):590-4.
42. McSweeney E and Walker RI. 1986. Identification and characterization of two *Campylobacter jejuni* adhesins for cellular and mucous substrates. *Infect. Immun.* 53: 141-148.
43. Modolo JR, Giuffrida R, CA de M Lopes. 2003. Antimicrobial Susceptibility of 51 *Campylobacter* Strains Isolated from Diarrheic and Diarrhea-Free dogs . *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, v.70, n.3, p.283-286
44. Moore JE and Matsuda M. 2002, The history of *Campylobacter*: taxonomy and nomenclature, *Irish Vet. J.*10 495–501.
45. Moore JE, Barton MD, Blair IS, Corcoran D, Dooley JS, Fanning S, Kempf I, Lastovica AJ, Lowery CJ, Matsuda M, McDowell DA, McMahan A, Millar BC, Rao JR, Rooney PJ, Seal BS, Snelling WJ, Tolba O. 2006. The epidemiology of antibiotic resistance in *Campylobacter*. *Microbes Infect.* 8(7):1955-66.
46. Nelson JM, Smith KE, Vugia DJ, Rabatsky-Ehr T, Segler SD, Kassenborg HD, Zansky SM, Joyce K, Marano N, Hoekstra RM, Angulo FJ. 2004. Prolonged diarrhoea due to ciprofloxacin resistant *Campylobacter* infection, *J. Infect. Dis.* 190; 1150e1157.

47. Parkhill J, Wren BW, Mungall K, Ketley JM, Churcher C, Basham D, Chillingworth T, Davies RM, Feltwell T, Holroyd S, Jagels K, Karlyshev AV, Moule S, Pallen MJ, Penn CW, Quail MA, Rajandream MA, Rutherford KM, van Vliet AH, Whitehead S, Barrell BG. 2000. The genome sequence of the food-borne pathogen *Campylobacter jejuni* reveals hypervariable sequences. *Nature*.10;403(6770):665-8.
48. Parsons BN, Porter CJ, Ryvar R, Stavisky J, Williams NJ, Pinchbeck GL, Birtles RJ, Christley RM, German AJ, Radford AD, Hart CA, Gaskell RM, Dawson S. 2009. Prevalence of *Campylobacter* spp. in a cross sectional study of dogs attending veterinary practices in the UK and risk indicators associated with shedding." *Vet J*.184(1):66-70.
49. Patton CM, SW Mitchell, ME Potter and AF Kaufmann. 1981. Comparison of selective media for primary isolation of *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni*. *J. Clin. Microbiol.* 13:326–330.
50. Pei, Z, Burucoa, C, Grignon, B, Baqar, S, Huang, XZ, Kopecko, DJ, Bourgeois AL, Fauchere JL and Blaser MJ. 1998. Mutation in the *peb1A* locus of *Campylobacter jejuni* reduces interactions with epithelial cells and intestinal colonization of mice. *Infect. Immun.* 66: 938-943.
51. Peterson MC. 2003. *Campylobacter jejuni* enteritis associated with consumption of raw milk. *J. Environ. Health* 65:20–21.
52. Rossi M, Hänninen ML, Revez J, Hannula M, Zanoni RG. 2008. Occurrence and species level diagnostics of *Campylobacter* spp., enteric *Helicobacter* spp. and *Anaerobiospirillum* spp. in healthy and diarrheic dogs and cats. *Vet Microbiol* 129(3-4):304-314.
53. Ruiz J et al. 1998, Increased resistance to quinolones in *Campylobacter jejuni*: A genetic analysis of *gyrA* gene mutations in quinolone-resistant clinical isolates. *Microbiol Immunol*;42:223–226.
54. Sack David A, Christine Lyke, Carol McLaughlin and Voravit Suwanvanichkij. 2001. Antimicrobial Resistance in Shigellosis, Cholera and Campylobacteriosis. WHO/CDS/CSR/DRS/2001.8
55. Saeed AM, Harris NV & Digiacomo, RF. 1993. The role of exposure to animals in the etiology of *Campylobacter jejuni/coli* enteritis." *American Journal of Epidemiology* 137, 108–14.
56. Sáenz Yolanda, Myriam Zarazaga, Marta Lantero, M José Gastañares, Fernando Baquero, and Carmen Torres. 2000. Antibiotic Resistance in *Campylobacter* Strains Isolated from Animals, Foods and Humans in Spain in 1997–1998. *Antimicrob. Agents Chemother.* vol. 44 no. 2267-271.
57. Sandberg M, Bergsjö B, Hofshagen M, Skjerve E, and Kruse H. 2002. Risk factors for *Campylobacter* infection in Norwegian cats and dogs. *Prev Vet Med*;55:241–253.
58. Schröder W and Moser I. 1997. Primary structure analysis and adhesion studies on the major outer membrane protein of *Campylobacter jejuni*. *FEMS Microbiol. Lett.* 150: 141-147.
59. Sebald M and Veron M. 1963. Teneur en bases de l'AND et classification des vibrions. *Annales de l'Institut Pasteur*, 105, 897.
60. Sekizuka T, Gondo T, Murayama O, Moore JE, Millar BC, Matsuda M. 2002. *flaA*-like sequences containing internal termination codons (TAG) in urease-positive thermophilic *Campylobacter* isolated in Japan, *Lett. Appl. Microbiol.* 35 185–189.
61. Sellu David P. 1986. *Campylobacter* enterocolitis: general and surgical aspects. *Postgraduate Medical Journal* 62: 719-726.

62. Semchenko EA, Day CJ, Wilson JC, Grice ID, Moran AP, Korolik V. 2010. Temperature dependent phenotypic variation of *Campylobacter jejuni* Lipooligosaccharides. BMC Microbiol. 30;10:305.
63. Shen Z, Y Feng, F E Dewhirst and JG Fox. 2001. Coinfection of enteric *Helicobacter* spp. and *Campylobacter* spp. in cats. J. Clin. Microbiol. 39:2166–2172.
64. Skirrow MB, Benjamin J. 1980. “1001” *campylobacters*: cultural characteristics of intestinal *campylobacters* from man and animals, J. Hyg. (Lond.) 85 427–442.
65. Smith KE, Besser JM, Hedberg CW, Leano FT, Bender JB, Wicklund JH, Johnson BP, Moore KA, Osterholm MT. 1999. Quinolone- resistant *Campylobacter jejuni* infections in Minnesota, 1992 e 1998. N. Engl. J. Med. 340 1525e1532.
66. Steele TW, McDermott SN. 1984. The use of membrane filters applied directly to the surface of agar plates for the isolation of *Campylobacter jejuni* from feces. Pathology. 16:263-265.
67. Tresierra-Ayala A and H Fernandez. 1997. Occurrence of thermotolerant *Campylobacter* species in domestic and wild monkeys from Peru. Zentbl. Veterinarmedizin B 44:61–64.
68. Tsai HJ, Huang HC, Lin CM, Lien YY, Chou CH. 2007, Salmonellae and *campylobacters* in household and stray dogs in northern Taiwan. Vet Res Commun.31(8):931-9.
69. Vandamme P, De Ley J. 1991. Proposal for a new family, *Campylobacteraceae*. Int J Syst Bacteriol; 41:451-5.
70. Wassenaar TM, van der Zeijst, BA, Ayling, R and Newell DG. 1993. Colonization of chicks by motility mutants of *Campylobacter jejuni* demonstrates the importance of flagellin A expression. J. Gen. Microbiol. 139: 1171-1175.
71. Wieland B, Regula G, Danuser J, Wittwer M, Burnens AP, Wassenaar TM, Stärk KD. 2005. *Campylobacter* spp. in dogs and cats in Switzerland: risk factor analysis and molecular characterization with AFLP. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health. 52(4):183-9.
72. Wolfs TFW, Duim B, Geelen SPM et al. 2001. Neonatal sepsis by *Campylobacter jejuni*: genetically proven transmission from a household puppy. Clinical Infectious Diseases 32, 97–9.
73. Workman SN, Mathison GE, Lavoie MC. 2005. Pet dogs and chicken meat as reservoirs of *Campylobacter* spp. in Barbados. J Clin Microbiol. 43(6):2642-50.
74. Yamazaki-Matsune Wataru, Masumi Taguchi, Kazuko Seto, Ryuji Kawahara, Kentaro Kawatsu, Yuko Kumeda, Miyoshi Kitazato, Masafumi Nukina, Naoaki Misawa and Teizo Tsukamoto. 2007. Development of a multiplex PCR assay for identification of *Campylobacter coli*, *Campylobacter fetus*, *Campylobacter hyointestinalis* subsp. *hyointestinalis*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter lari* and *Campylobacter upsaliensis*. Journal of Medical Microbiology, 56, 1467–1473.
75. Yao R, Burr DH and Guerry P. 1997. CheY-mediated modulation of *Campylobacter jejuni* virulence. Mol. Microbiol. 23: 1021-1031.
76. Young Kathryn T, Lindsay M Davis & Victor J Di Rita. 2007. *Campylobacter jejuni*: molecular biology and pathogenesis. Nat Rev Microbiol. 5(9):665-79.

Webgrafia

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>
- <http://campylobacter.izs.it/campylobacter/index.jsp>
- <http://www.epicentro.iss.it/default.asp>
- <http://www.izsvenezie.it/index.php>
- <http://www.sicurezza degli alimenti.it/campylobacter.htm>
- <http://en.wikipedia.org/wiki/Campylobacter>
- <http://www.hpa.org.uk/cfi/esl/default.htm>
- <http://www.bioaesis.com/>
- http://www.mikrogen.de/uploads/tx_oemikrogentables/dokumente/GIRLCJIT.pdf
- <http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Campylobacter>
- <http://www.sanger.ac.uk/>
- <http://www.efsa.europa.eu/it/efsajournal/pub/2090.htm>
- <http://www.sciencephoto.com/search/searchLogic.html?country=205&y=0&page=1&frontpage=1&searchstring=Campylobacter&x=0>
- <http://www.cdc.gov/foodnet/>

Ringraziamenti

Desidero molto ringraziare la mia relatrice, la dottoressa Alessandra Piccirillo, ed i mie due correlatori, la dottoressa Martina Giacomelli ed il dottor Luigi Michele Coppola, per avermi dato la possibilità di iniziare e completare questa interessante ricerca e per avermi sempre seguito e sostenuto.

Un grazie speciale va ai miei genitori ed a mia sorella, che mi sono sempre stati vicini in questi anni, motivandomi ed aiutandomi quando serviva. Grazie a loro ed alla loro gentilezza sono riuscito a coronare uno dei mie sogni più grandi: diventare veterinario.

Mille grazie anche alle mie zie, Marisa e Monica, per il preziosissimo sostegno e l'inestimabile affetto che mi hanno dimostrato in tutti questi anni. Grazie anche ai mie nonni, che sono sempre nei miei pensieri, so che desideravano tanto vedere questo giorno e che mi saranno accanto per aiutarmi a superarlo al meglio.

Un caloroso ringraziamento ai miei amici che hanno sempre creduto in me e mai una volta hanno dubitato che in fine sarei riuscito a giungere questo traguardo. Un grazie speciale ai miei amici di vecchia data Enea, Tommaso, Mastro, Lisa, Giacomo, Cristina, Luca ed agli amici che ho trovato all'università Sara, Elena, Chiara, Silvia, Eros, Federico, Serena, Emanuel, Riccardo.

Come dimenticare i miei coinquilini? Eros, Sara, Federico, Serena, Riccardo e Giovanni! Sebbene siate compresi nei ringraziamenti agli amici un grazie in più ve lo devo per avermi sopportato per anni e anni.

Un grazie anche a tutto il personale della Clinica Veterinaria dell'Università di Padova per aver permesso lo svolgimento del campionamento degli animali presenti nella struttura.

Grazie a tutte le persone che mi sono state vicine in questi anni e che col loro affetto mi hanno aiutato nel mio percorso.

L'ultimo ringraziamento, ma non ultimo in importanza, lo rivolgo ad una amica preziosissima: Sara Còssaro. La ringrazio per essere sempre presente nei momenti di bisogno, per aver sempre la pazienza di sopportarmi, per la dedizione con cui coltiva la nostra amicizia e per il suo umore solare che rende sempre speciali le mie giornate.