

Ricerca di patogeni mediante tecniche biomolecolari
Campylobacter

Biotechnologie applicate all'ispezione
degli alimenti di origine animale

Dip. di Medicina Veterinaria e Produzioni animali

tiziana.pepe@unina.it

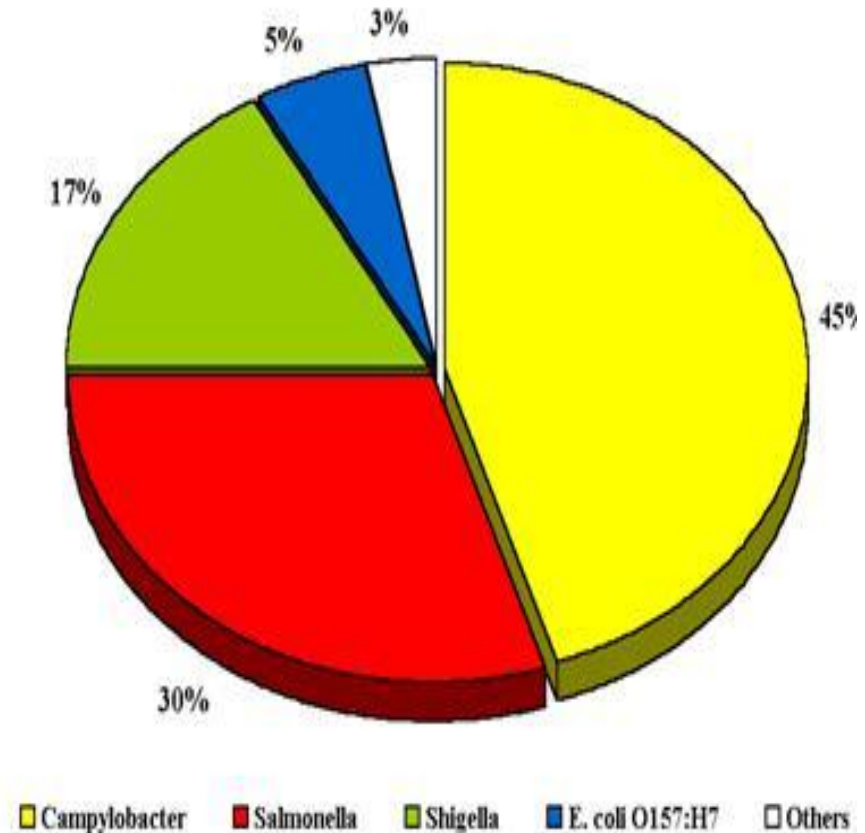
- Campylobacter è classificato tra i “**patogeni emergenti**” in quanto sconosciuto fino a qualche decennio fa.
- È stato isolato nella maggioranza dei casi di enterite umana di origine alimentare.
- I Campylobacter sono un gruppo di batteri su cui è in corso **un’intensa opera di revisione critica delle conoscenze.**

❖ *Campylobacter* è tra i principali patogeni veicolati dagli alimenti è responsabile di patologie gastroenteriche più di *Salmonella* spp., *Shigella* spp. ed *E. coli* O157H7.

❖ ENTER-NET Italia¹

segnala nel 2005 un aumento degli isolamenti da campioni clinici di *Campylobacter* spp. (78,2 % *C. jejuni* e 4,1 % a *C. coli*).

¹ Sezione nazionale della rete europea di sorveglianza per gli enterobatteri patogeni coordinato dall'ISS



Principali batteri causa di patologie alimentari

Famiglia : Campylobacteriaceae

Genere : Campylobacter

(inizialmente incluso nel genere Vibrio)

Il genere Campylobacter comprende 15 tra specie e sottospecie: 12 di esse sono responsabili di patologie dell'uomo e degli animali.

Specie di interesse patologico: **C. jejuni, C. coli, C. lari, C. upsaliensis, C. mucosalis.**

- **Microrganismo di piccole dimensioni**
(lungo 0,5-5 μm e largo 0,2-0,5 μm)
- **Forma bastoncellare, sottile e spiraliforme** (a forma di S)
- **Gram negativo**
- **Mobile e rapido in quanto dotato di sottili flagelli**
- **Vive bene in microaerofilia** (O_2 dal 5 al 10%) **o in anaerobiosi**
- **Cresce bene a 37°C**

(**C. jejuni** e **C. coli** rientrano nel sottogruppo dei **Campylobacter termofili** perchè crescono bene a 42°-43°C)

I principali fattori di patogenicità di *Campylobacter* sono rappresentati dalla **mobilità** (solo i ceppi mobili sono patogeni), e dalla capacità di sintetizzare alcune proteine come le **adesine** (che si legano ai recettori specifici degli enterociti), le **invasine** (permettono di invadere la sottomucosa) e delle potenti **citotossine** e **enterotossine**.

Le specie coinvolte nell'insorgenza di patologie sono:

- **Campylobacter jejuni** (isolato nel 99% dei casi di **enteriti umane**)
- **Campylobacter Coli** (isolato meno frequentemente)

C. jejuni comprende tre sottospecie:

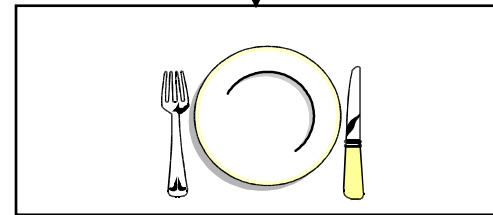
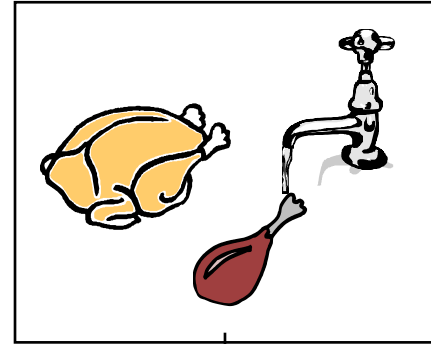
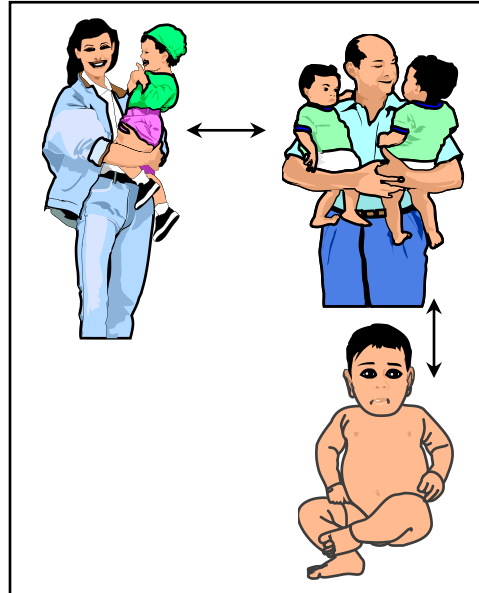
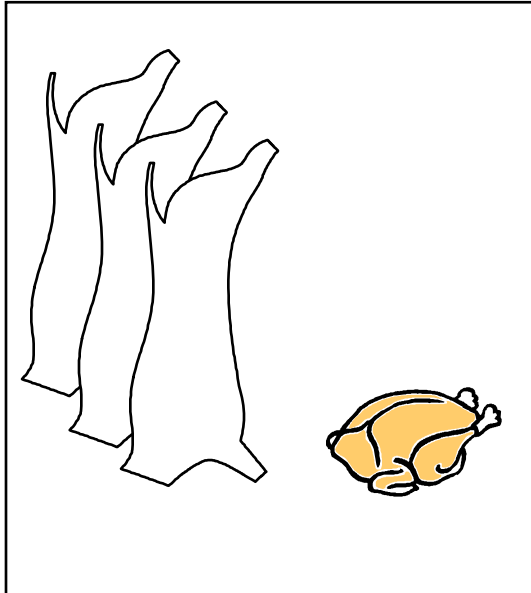
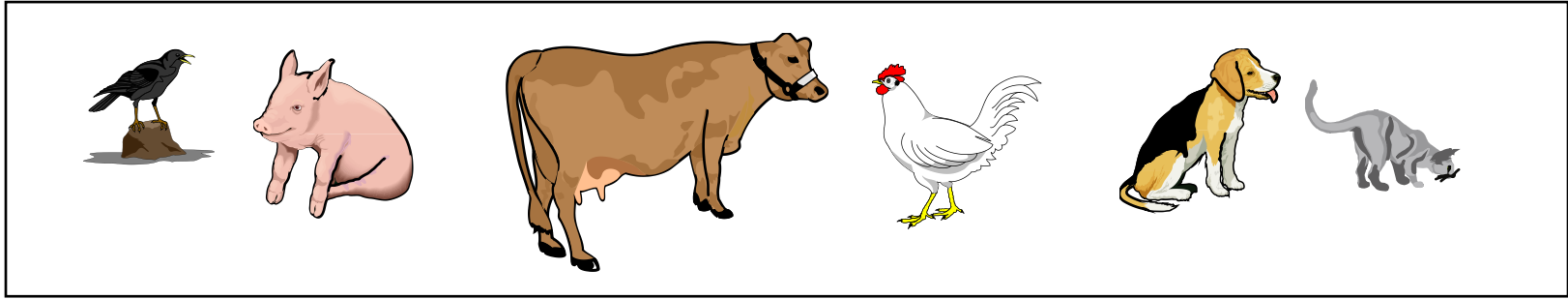
1. C. jejuni subsp.jejuni (principale agente di enterite umana, nel mondo)
2. C. jejuni subsp.doylei (provoca gastroenterite, gastrite, setticemia in uomo e animali)
3. C. jejuni subsp.fetus (agente di aborto in uomo e animali)

- L'infezione da ***Campylobacter*** è contratta attraverso l'assunzione **per os** di alimenti contaminati
- Giunto a livello intestinale la morfologia spiraliforme e la presenza dei **flagelli** gli permettono di muoversi nel muco della parete intestinale.
- Aderisce alle cellule epiteliali enteriche probabilmente grazie alle **adesine** poste sui flagelli.
- L'adesione alle **cellule HeLa** è correlata alla virulenza dell'infezione.
- **Il movimento flagellare e l'adesione** favoriscono l'instaurarsi dell'infezione

- I *Campylobacter* giunti a livello intestinale, invadono le Caco-2 cells tramite le **invasine** formando dei vacuoli interni (l'internalizzazione forse avviene con meccanismi di **endocitosi microtubuli-dipendenti**)
- L'organismo reagisce all'invasione e alla produzione di **enterotossine** attivando le cellule della difesa immunitaria.
- Biopsie e autopsie hanno evidenziato la formazione di **enterite infiammatoria acuta** in presenza di *C. jejuni* : i tessuti coinvolti mostrano edema della lamina propria con infiltrazione di neutrofili, cellule mononucleari e talvolta eosinofili.

- **Diarrea** di intensità variabile (**spesso a carattere emorragico**)
- **Febbre**
- **Dolori addominali**
- **Nausea e vomito**
- **Mal di testa**
- Meno frequentemente si instaurano **batteriemia, artriti settiche o altre patologie extraintestinali.**
- Il **decesso** è **raro** e riguarda soprattutto le **categorie di consumatori a rischio o con patologie intercorrenti.**

- Il principale serbatoio batterico è rappresentato dal **tratto intestinale** di un'ampia varietà di animali a sangue caldo (**bovini, suini, cani, gatti e soprattutto il pollame**).
- Le carni di **pollame** se contaminate dal contenuto fecale durante la macellazione e l'eviscerazione costituiscono la principale via di trasmissione di *Campylobacter*.



Rappresentazione schematica delle principali modalità di trasmissione di Campylobacter.

Le carcasse di pollo intere e i vari tagli ottenibili rappresentano la più importante fonte di trasmissione del **Campylobacter** all'uomo.



Carcasse di pollo intere

- I *Campylobacter* sono rapidamente uccisi dai trattamenti termici di pastorizzazione (non resistono più di 1 minuto a 60°C) e danneggiati dalle basse temperature, anche se una volta congelati sopravvivono per molti mesi a -20°C.
- Sono distrutti dall'essiccamento e dall'O₂ atmosferico, dal pH compreso tra 5 e 9 e dai comuni disinfettanti (ipocloriti, fenoli, iodofori e composti dell'ammonio quaternario).
- Risultano poco resistenti ai raggi UV e ai raggi γ .
- Sopravvivono in ambiente con alte concentrazioni di NaCl (carni salate crude)

- Si stanno rapidamente diffondendo, tra gli animali, nell'ambiente e nell'uomo ceppi di *Campylobacter* antibiotico-resistenti.
- Tra il 1997 e il 2001 la percentuale di ceppi di *Campylobacter* resistenti è salita in misura decisiva, soprattutto contro il **ciprofloxacina**.
- Su 180 ceppi di *Campylobacter* isolati da carni avicole, il 10% è risultato resistente al ciprofloxacina.

- I campioni di alimenti sono collocati, in modo asettico, in provette contenenti Bolton Selective Broth (brodo di arricchimento)
- Incubazione (4h 37 °C e 42 °C 24-48h)
- Dopo la crescita un'aliquota di 10 µl è prelevata e strisciata su terreno selettivo (Campylobacter blood-free selective medium)
- Le piastre sono poste in condizioni di microaerofilia ed incubate a 42 °C per 48 ore.

1. Prove di riconoscimento del *Campylobacter* termofilo secondo **norma ISO 10272-1:2006(E) ***

Questa norma prevede prima l'attuazione di **tre prove** per la caratterizzazione batterica:

- ❖ Morfologia e motilità
- ❖ Ossidasi e catalasi test
- ❖ Idrolisi dell'ippurato

*Manual for Reporting on Zoonoses, Zoonotic Agents, Antimicrobial Resistance and Food-borne Outbreaks in the framework of Directive 2003/99/EC (www.efsa.europa.eu/zoonoses)

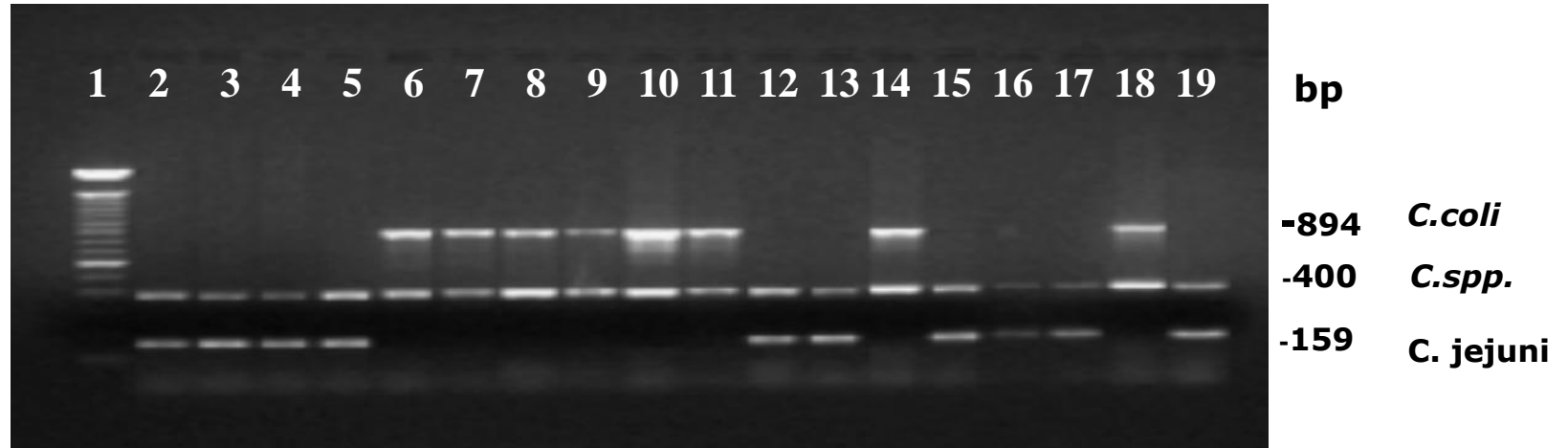
2. Una piccola ansata batterica è sottoposta ad **estrazione del DNA** mediante l'utilizzo di kit presenti in commercio

3. La metodica più utilizzata per l'**identificazione** di specie è la **PCR multiplex**

La miscela di amplificazione è composta da:

- ✓ DNA estratto
- ✓ Soluzione tampone
- ✓ dNTPs (nucleotidi trifosfati)
- ✓ Primers specifici
- ✓ Taq DNA polymerase

I prodotti di amplificazione sono separati mediante elettroforesi in gel di agarosio e visualizzati con transilluminatore UV, previa colorazione con bromuro di etidio.



Lane 1 : ladder

Lanes 2 - 5, 12 - 13, 15 - 17 e 19: *C. jejuni*

Lanes 6 - 11, 14 e 18: *C. coli*

Elettroforesi su gel di agarosio applicata a ceppi batterici di *C.jejuni* e *C.coli*