

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN
“EPIDEMIOLOGIA E CONTROLLO DELLE
ZONOSI”

Ciclo XX

Settore scientifico disciplinare di afferenza: VET-05

TITOLO TESI

Indagine sulla presenza di *Helicobacter pullorum* in
allevamenti avicoli italiani

Presentata da: Dr. Mirko Rossi

Coordinatore Dottorato

Prof. Luigi Morganti

Relatore

Prof. Renato Giulio Zanoni

Esame finale anno 2008

Para a Joana

*Hà-de haver uma cor por descobrir
Um juntar de palavra escondido
Hà-de haver uma chave para abrir
A porta deste muro desmedido*

*(José Saramago, *Hà-de aver...*)*

INDICE

PARTE GENERALE	7
Capitolo 1 Genere <i>Helicobacter</i>	9
Capitolo 2 <i>Helicobacter pullorum</i>	21
PARTE SPERIMENTALE	31
Presentazione	33
Capitolo 1 Ottimizzazione dei metodi di isolamento di <i>Helicobacter pullorum</i> da matrice policontaminata	35
Capitolo 2 Isolamento di <i>Helicobacter pullorum</i> da contenuto ciecale di broiler, galline ovaiole, tacchini e struzzo, caratterizzazione fenotipica e tipizzazione genotipica degli isolati	55
Capitolo 3 Indagine sulla presenza di <i>Helicobacter pullorum</i> da feci di pazienti umani affetti da patologia gastroenterica	85
Capitolo 4. Antibiotico resistenza in <i>Helicobacter pullorum</i>	93
Conclusioni	119
RINGRAZIAMENTI	123
BIBLIOGRAFIA	125

PARTE GENERALE

CAPITOLO 1

Genere *Helicobacter*

1.1 Tassonomia del genere *Helicobacter*

Il genere *Helicobacter* è stato originariamente descritto nel 1989 da Goodwin *et al.* i quali, sulla base di caratteristiche fenotipiche e genotipiche quali la composizione in acidi grassi della membrana cellulare, la sensibilità ad alcuni antibiotici e la sequenza del rRNA, classificarono in questo nuovo genere le specie [*Campylobacter pylori*] e [*Campylobacter mustelae*], isolate rispettivamente dallo stomaco di uomo (Marshall *et al.*, 1985) e di furetto (Fox *et al.*, 1988).

Vandamme *et al.* (1991), sulla base dell'analisi filogenetica delle sequenze del rRNA, inserirono il genere *Helicobacter* nella Superfamiglia VI, un nuovo *taxon* distinto fra gli eubatteri della classe Proteobacteria comprendente anche i generi *Campylobacter*, *Arcobacter* e *Wolinella*. Contestualmente alla nuova collocazione del genere *Helicobacter* tra i Proteobatteri, Vandamme *et al.* (1991) trasferirono in questo genere altre due specie, [*Campylobacter fennelliae*] e [*Campylobacter cinaedi*], isolate per la prima volta da Totten *et al.* nel 1985 da feci di pazienti umani immunodepressi.

Da questo momento la classificazione del genere *Helicobacter* si è basata principalmente sulle relazioni filogenetiche determinate dall'analisi del 16S rRNA, portando alla descrizione di numerose nuove specie o nuovi *taxa*.

Questo criterio classificativo si è dimostrato in seguito non valido in quanto negli *Helicobacter* la filogenesi derivante dall'analisi delle sequenze del 16S rRNA risulta spesso in conflitto con altri dati molecolari quali l'ibridazione DNA-DNA o dati fenotipici, a seguito di un'elevata frequenza di ricombinazione interspecifica (Dewhirst *et al.*, 2005).

Modernamente, per una corretta classificazione di questi microrganismi si ricorre ad un approccio polifasico (Vandamme *et al.*, 2000) che prevede l'integrazione di molte informazioni sia fenotipiche (dati biochimici, profilo proteico totale, acidi grassi totali, ecc.) che genotipiche (ibridizzazione DNA-DNA, filogenesi di diversi geni *housekeeping*, *fingerprinting* dell'intero genoma). Questo approccio è stato utilizzato per revisionare lo *status* tassonomico di molti isolati (On *et al.*, 2005).

Attualmente il Bergey's Manual of Systematic Bacteriology inserisce il genere *Helicobacter*, insieme ai generi *Thiovulum* e *Wolinella*, nella famiglia *Helicobacteriaceae*, Ordine *Campylobacterales*, Classe *Epsilonproteobacteria* (On *et al.*, 2005).

Il genere *Helicobacter* include attualmente 31 specie validamente descritte, due *taxa* candidati ("Candidatus") alla descrizione di due nuove specie (vedi tabella 1) ed almeno dieci differenti *taxa* che potrebbero potenzialmente essere inseriti come nuove specie ma il cui *status* tassonomico non è ancora stato definito correttamente (On *et al.*, 2005).

Tabella 1. Elenco, in ordine cronologico di descrizione, delle 31 specie di *Helicobacter* e delle due specie “*Candidatus*”, aggiornato al 2008. Per ogni specie vengono indicati il sito primario d’isolamento, gli ospiti da cui è stata isolata e la referenza bibliografica relativa alla prima descrizione e ad eventuali successive riclassificazioni.

Specie	Sito primario	Ospiti	Referenza
<i>H. pylori</i> (specie tipo)	Stomaco	Uomo	Marshall <i>et al.</i> , 1985 Goodwin <i>et al.</i> , 1989
<i>H. cinaedi</i>	Intestino	Uomo, criceto, cane, gatto	Totten <i>et al.</i> 1985 Vandamme <i>et al.</i> 1991
<i>H. fennelliae</i>	Intestino	Uomo	Totten <i>et al.</i> 1985 Vandamme <i>et al.</i> 1991
<i>H. mustelae</i>	Stomaco	Furetto, visone	Fox <i>et al.</i> 1988 Goodwin <i>et al.</i> 1989
<i>H. felis</i>	Stomaco	Gatto, cane	Paster <i>et al.</i> 1991
<i>H. nemestrinae</i>	Stomaco	Macaco	Bronsdon <i>et al.</i> 1991 Suerbaum <i>et al.</i> , 2002
<i>H. muridarum</i>	Intestino, stomaco	Topo, ratto	Lee <i>et al.</i> 1992
<i>H. acinonychis</i>	Stomaco	Ghepardo	Eaton <i>et al.</i> 1993
<i>H. canis</i>	Intestino	Cane, gatto, uomo	Stanley <i>et al.</i> 1993
<i>H. hepaticus</i>	Intestino, fegato, cistifellea	Topo	Fox <i>et al.</i> 1994
<i>H. pametensis</i>	Intestino	Rondine di mare, oche selvatiche, suino, gatto	Dewhirst <i>et al.</i> 1994
<i>H. pullorum</i>	Intestino, fegato, cistifellea	Pollo, tachino, pernice, struzzo, pappagallo, uomo	Stanley <i>et al.</i> 1994
<i>H. bilis</i>	Intestino, fegato, cistifellea, stomaco	Topo, ratto, cane, gatto, uomo	Fox <i>et al.</i> 1995 Hänninen <i>et al.</i> 2005
<i>H. bizzozeronii</i>	Stomaco	Cane	Hänninen <i>et al.</i> 1996
<i>H. trogontum</i>	Intestino	Ratto, pecora, suino	Mendes <i>et al.</i> 1996 Hänninen <i>et al.</i> 2003
<i>H. cholecystus</i>	Intestino	Criceto siriano	Franklin <i>et al.</i> 1996
<i>H. rodentium</i>	Intestino	Topo	Shen <i>et al.</i> 1997
<i>H. salomonis</i>	Stomaco	Cane	Jalava <i>et al.</i> 1997
<i>H. mesocricetorum</i>	Intestino	Criceto siriano	Simmons <i>et al.</i> 2000
<i>H. canadensis</i>	Intestino	Uomo, Oche, selvatiche, pernice	Fox <i>et al.</i> 2000

Tabella 1 (continua)

Specie	Sito primario	Ospiti	Referenza
<i>H. aurati</i>	Intestino, stomaco	Criceto siriano	Patterson <i>et al.</i> 2000
<i>H. ganmani</i>	Intestino	Topo, uomo	Robertson <i>et al.</i> 2001
<i>H. typhlonius</i>	Intestino	Topo	Franklin <i>et al.</i> 2001
<i>H. marmotae</i>	Intestino, fegato	Marmotta, gatto	Fox <i>et al.</i> 2002
<i>H. cetorum</i>	Stomaco	Delfino, balena	Harper <i>et al.</i> 2002
<i>H. brantae</i>	Intestino	Oche selvatiche	Fox <i>et al.</i> 2006
<i>H. anseris</i>	Intestino	Oche selvatiche	Fox <i>et al.</i> 2006
<i>H. cynogastricus</i>	Stomaco	Cane	Van den Buck <i>et al.</i> 2006a
<i>H. equorum</i>	Intestino	Cavallo	Moyaert <i>et al.</i> 2007
<i>H. callitrichis</i>	Intestino	Uistiti	Won <i>et al.</i> 2007
<i>H. baculiformis</i>	Stomaco	Gatto	Baele <i>et al.</i> 2008
<i>Candidatus</i> * “ <i>H. suis</i> ”	Stomaco	Suino	De Groote <i>et al.</i> 1999a
<i>Candidatus</i> * “ <i>H. bovis</i> ”	Stomaco	Bovino	De Groote <i>et al.</i> 1999b

* *Candidatus* = specie ancora non validamente descritta in quanto la descrizione è basata solo su sequenze di DNA ottenute mediante amplificazione diretta dal campione.

1.2 Caratteristiche del genere *Helicobacter*

Vengono di seguito riportate in maniera sintetica le caratteristiche del genere *Helicobacter* descritte da On *et al.* (2005) nel Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology.

Gli *Helicobacter* sono bacilli Gram negativi, non sporigeni, di forma spiralata, curvata o fusata con estremità arrotondate od appuntite. Quando presenti, le spire possono apparire più o meno ravvicinate a seconda della specie, delle condizioni colturali e dell’età della coltura. Nelle colture vecchie o in seguito a prolungata

esposizione alla concentrazione atmosferica di ossigeno, i batteri possono assumere forma coccoide, così come osservato nei *Campylobacter*.

La presenza di flagelli, singoli o multipli, polari o bipolari, conferiscono mobilità che si esprime o con rapidi movimenti a “cavatappi” o con lenti movimenti ondulatori.

H. pullorum, *H. canadensis*, *H. ganmani*, *H. rodentium* e *H. mesocricetorum* sono le uniche specie che non presentano flagelli rivestiti da guanina.

Studi ultrastrutturali hanno messo in evidenza come alcune specie (*H. bilis*, *H. trogontum*, *H. aurati*, *H. felis*, *H. muridarum*) presentino fibre periplasmiche o una struttura elettrondensa, esterna alla superficie della cellula, simile ad una capsula o ad un glicocalice (*H. pylori*, *H. mustelae*, *H. felis*).

Tutte le specie sono microaerofile, non crescono in condizioni aerobie e solo alcune sono in grado di crescere in anaerobiosi.

Diversamente da quanto osservato per alcune specie di *Campylobacter*, gli *Helicobacter* non risultano dipendenti dalla presenza di un'atmosfera arricchita di idrogeno ($\approx 5\%$), sebbene il suo utilizzo ne favorisca la crescita facilitandone l'isolamento.

Gli *Helicobacter* presentano un metabolismo respiratorio. Sebbene i metodi standard non rilevino né ossidazione né fermentazione dei carboidrati, lo studio dell'intero genoma di *H. pylori* ha dimostrato, contrariamente a quanto osservato per i *Campylobacter*, la presenza di vie metaboliche per il glucosio.

L'analisi del genoma di *H. pylori* e di *H. hepaticus* ha inoltre permesso di evidenziare: vie metaboliche per il piruvato, per gli aminoacidi serina, alanina, arginina e glutamina; la presenza di enzimi coinvolti nella via dei pentosi fosfati (implicata nella

biosintesi) e nella via di Entner-Doudoroff (implicata nell'ossidazione del glucosio); la mancanza, a differenza di quanto osservato in *Campylobacter*, del ciclo completo degli acidi tricarbossilici (TCA).

Molte specie, soprattutto quelle adattate alla nicchia gastrica, producono l'enzima *ureasi* che interviene sia come meccanismo di protezione verso l'acidità gastrica (la liberazione di ioni ammonio in seguito all'idrolisi dell'urea contribuisce a tamponare l'acidità dell'ambiente gastrico), sia come mezzo di approvvigionamento di azoto.

Molte specie risultano positive al test della catalasi e tutte al test dell'ossidasi.

1.3 Filogenesi del genere *Helicobacter*

Il genere *Helicobacter* è comunemente suddiviso in 2 gruppi definiti sulla base della loro nicchia ecologica: *Helicobacter* gastrici, tutti *ureasi* positivi adattati all'ambiente gastrico nell'uomo e in altre specie di mammiferi; *Helicobacter* enterici o enteroepatici, isolati dall'intestino, fegato e cistifellea di uomo e di diverse specie animali sia mammiferi che uccelli.

Gli *Helicobacter* enterici possono a loro volta essere grossolanamente suddivisi in *ureasi* positivi e negativi. Tra gli *Helicobacter* enterici *ureasi* positivi si distingue un sottogruppo di specie (*H. bilis*, *H. trogontum*, *H. aurati* e i taxa non ancora classificati riferibili a "*H. rappini*") caratterizzato da elevata convergenza tassonomica e da una comune morfologia ultrastrutturale.

Dal punto di vista strettamente filogenetico il genere *Helicobacter* può essere suddiviso in tre distinti gruppi parafiletici denominati: *Helicobacter* gastrici,

Helicobacter enteroepatici ed *Helicobacter* con flagelli non rivestiti (Dewhirst *et al.*, 2005).

Questa divisione si basa sull'analisi delle sequenze delle due subunità ribosomiali 23S rRNA (figura 1) (Dewhirst *et al.*, 2005) e 16S rRNA (figura 2) (On *et al.*, 2005) e di altri geni quali *groEL* (Mikkonen *et al.*, 2004) e *gyrB* (figura 3) (Hannula e Hänninen, 2007). Gli studi filogenetici riflettono chiaramente le differenze ecologiche e fenotipiche delle diverse specie di *Helicobacter*.

In modo particolare la distinzione tra il gruppo delle specie gastriche ed enteriche è un dato filogeneticamente costante. Anche sulla base delle sequenze dei geni *ureA* (Gueneau e Loiseaux-De Goër, 2002) o *ureB* (figura 4, Hänninen *et al.*, 2005) gli *Helicobacter* gastrici si separano da quelli enteroepatici.

Un altro dato filogeneticamente costante che trova riscontro dal punto di vista fenotipico riguarda la suddivisione degli *Helicobacter* a nicchia enterica *ureasi* negativi in due linee filogeneticamente separate: parte delle specie vanno a confluire nel cluster degli *Helicobacter* enteroepatici insieme agli altri *Helicobacter* enterici *ureasi* positivi; la restante parte va a costituire un cluster separato che raggruppa gli *Helicobacter* che presentano flagelli non rivestiti e che include le specie *H. pullorum*, *H. canadensis*, *H. rodentium*, *H. mesocricetorum* e *H. ganmani*.

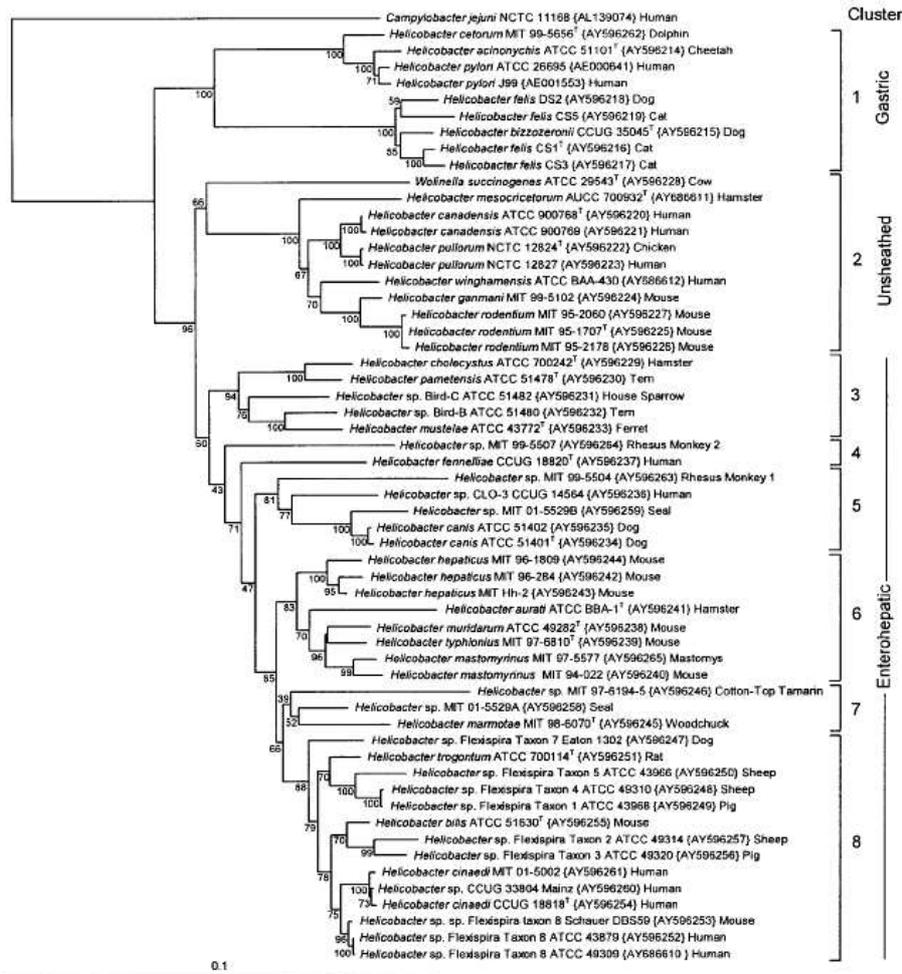


Figura 1. Filogramma in cui si evidenziano, sulla base dell'analisi delle sequenze del 23S rRNA, le relazioni filogenetiche tra le diverse specie di *Helicobacter* e alcuni *taxa* non ancora validamente descritti (Dewhirst *et al.*, 2005). Unsheathed = flagelli non rivestiti.

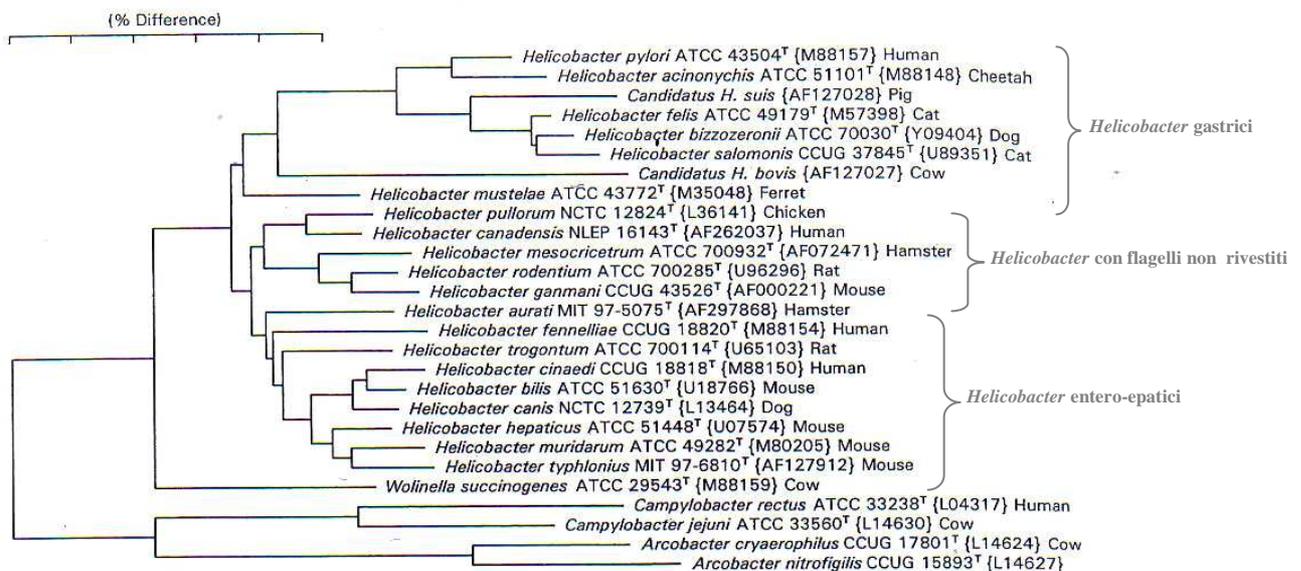


Figura 2. Filogramma in cui si evidenziano, sulla base dell'analisi delle sequenze del 16S rRNA, le relazioni filogenetiche tra diverse specie di *Helicobacter* ed i generi correlati (On *et al.*, 2005).

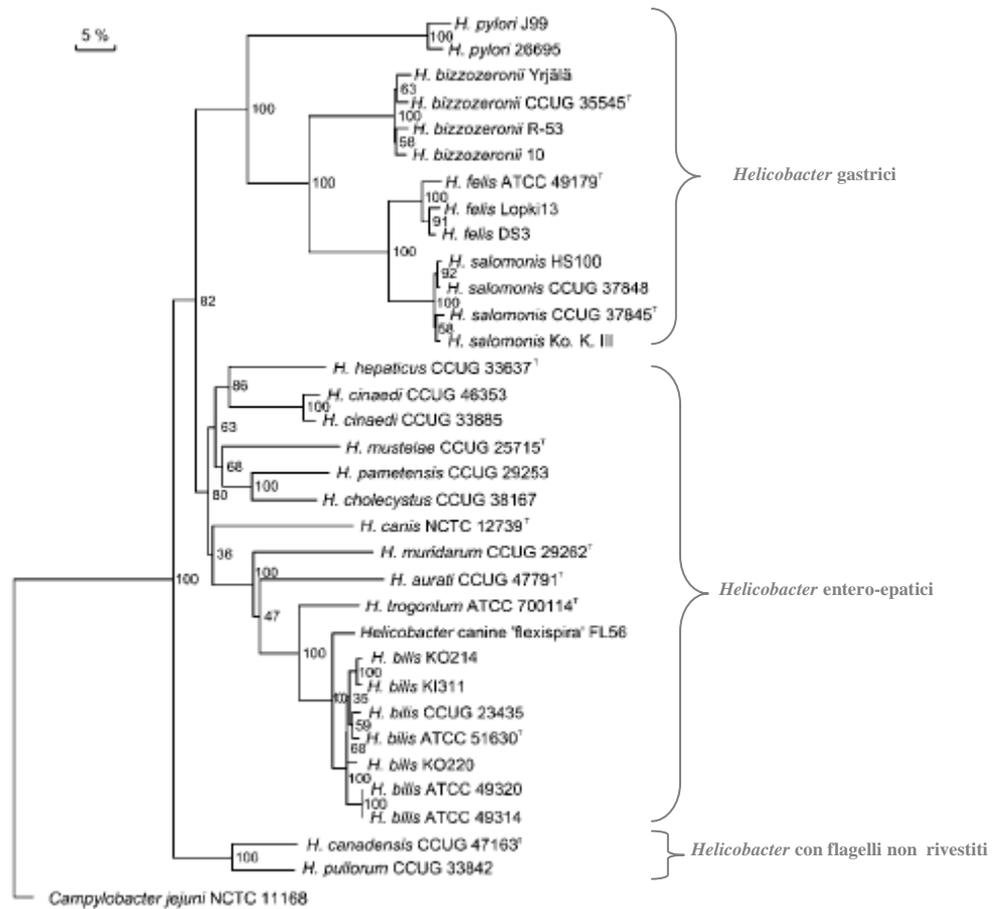


Figura 3. Filogramma in cui si evidenziano, sulla base dell'analisi delle sequenze del gene *gyrB*, le relazioni filogenetiche tra diverse specie di *Helicobacter* (Hannula e Hänninen, 2007).

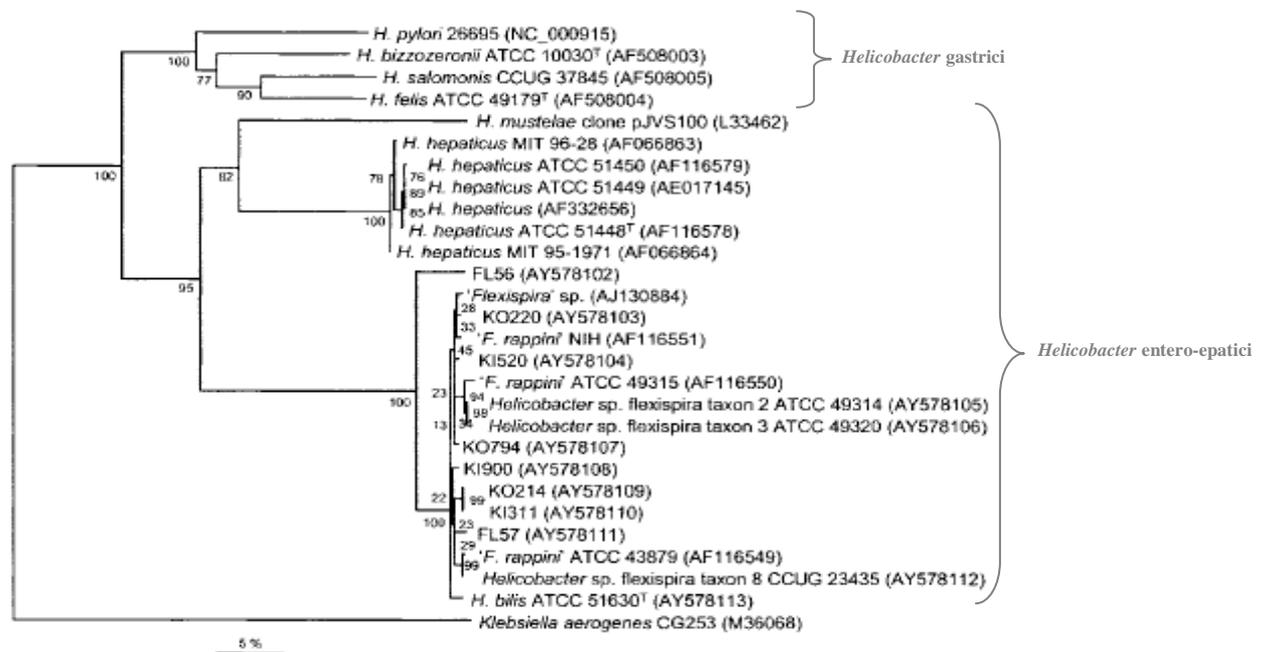


Figura 4. Filogramma in cui si evidenziano, sulla base dell'analisi delle sequenze del gene *ureB*, le relazioni filogenetiche tra le diverse specie di *Helicobacter* ureasi positive (Hänninen *et al.*, 2005).

1.4 Ruolo patogeno di *Helicobacter*

Allo stato attuale delle conoscenze solo due specie di *Helicobacter* sono state riconosciute come agenti eziologici di patologia nell'uomo o negli animali.

H. pylori colonizza lo stomaco di più della metà della popolazione umana ed è l'unico battere formalmente riconosciuto quale agente eziologico di carcinoma nell'uomo. Risulta responsabile di circa il 5,5% di tutti i tumori umani con una incidenza di circa 592.000 nuovi casi ogni anno (Suerbaum e Josenhans, 2007).

H. hepaticus è stato riconosciuto come agente eziologico di numerose patologie nel topo: epatite cronica attiva, tiflocolite e carcinoma epatico in soggetti immunocompetenti (Solnick e Schauer, 2001; Ljungh e Wadstrom, 2002) e di malattie infiammatorie intestinali (*Inflammatory Bowel Disease-IBD*) in alcune linee di topo immunodeficienti (Ward *et al.*, 1996; Cahill *et al.*, 1997; Kullberg *et al.*, 1998; Chin *et al.*, 2000). Per quanto riguarda le altre specie di *Helicobacter*, si sta dibattendo se debbano essere considerate responsabili di patologie gastriche, intestinali o epatobiliari o normali componenti della flora gastroenterica dell'uomo o degli animali.

Frequentemente l'isolamento di questi microrganismi è stato associato a diverse patologie sia nell'uomo che negli animali. Nell'uomo, *H. hepaticus* è stato associato a carcinoma epatico, ad IBD, ad *Irritable Bowel Syndrome* (IBS) ed a pancreatite cronica (Ge *et al.*, 2001; Apostolov *et al.*, 2005; Nilsson *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2006).

H. bilis è stato associato a colecistite cronica nonché a forme neoplastiche dei dotti biliari e della cistifellea (Fox *et al.*, 1998; Solnick e Schauer, 2001; Matsukura *et al.*, 2002; Murata *et al.*, 2004; Kobayashi *et al.*, 2005), *H. cinaedi* a batteriemia, setticemia,

meningite, enterite, artrite ed a cellulite in neonati ed in adulti immunocompromessi (Orlicek *et al.*, 1993; Burman *et al.*, 1995; Sullivan *et al.*, 1997; Uckay *et al.*, 2006; Simons *et al.*, 2004), *H. pullorum* a gastroenterite (Burnens *et al.*, 1994; Steinbrueckner *et al.*, 1997; Melito *et al.*, 2000), epatite ed a carcinoma epatico (Fox *et al.*, 1998; Ponzetto *et al.*, 2000).

H. canis è stato isolato per la prima volta in un bambino affetto da gastroenterite (Burnens *et al.*, 1993) e più recentemente da pazienti umani immunocompetenti in corso di batteriemia o da soggetti affetti da cellulite multifocale (Solnick e Schauer, 2001; Leemann *et al.*, 2006; Prag *et al.*, 2007).

Anche negli animali sono frequenti le segnalazioni che associano la presenza di alcuni *Helicobacter* a patologie di diversa natura. *H. bilis* è stato associato ad epatite multifocale nel topo, a tiflocolite e a diarrea in roditori immunocompromessi (Fox *et al.*, 1995; Franklin *et al.*, 1998; Haines *et al.*, 1998). *H. cholecystus* è stato considerato responsabile di colangiofibrosi e pancreatite centrolobulare in criceti (Franklin *et al.*, 1996) mentre *H. hepaticus*, *H. bilis*, *H. rodentium* e *H. cinaedi* sembrano giocare un importante ruolo nell'insorgenza di calcoli biliari nei roditori (Maurer *et al.* 2005).

H. canis è stato isolato in un cucciolo di cane che presentava epatite multifocale necrotizzante (Fox *et al.*, 1996) e in cani e gatti di diversa età con diarrea (Foley *et al.*, 1999; Rossi *et al.*, 2007). *H. pullorum* è stato isolato dal fegato di galline ovaiole che presentavano lesioni riferibili ad epatite vibrionica (Burnens *et al.*, 1996).

CAPITOLO 2

Helicobacter pullorum

2.1 Tassonomia

La prima descrizione di *H. pullorum* risale al 1994, quando Stanley *et al.* riesaminarono 16 ceppi batterici isolati dall'intestino cieco di broiler, dal fegato e contenuto intestinale di ovaiole e da feci di uomo con gastroenterite, e che erano stati originariamente classificati come *Campylobacter Like Organisms* (CLO) in quanto non identificabili tra le specie già descritte.

La caratterizzazione fenotipica, l'analisi del 16S rRNA e l'analisi del profilo proteico permisero di identificare tutti i 16 isolati come *Helicobacter* e di classificarli come una nuova specie: *Helicobacter pullorum*.

H. pullorum risulta correlato filogeneticamente a *H. canadensis*, *H. ganmani*, *H. mesocricetorum* e *H. rodentium*, insieme ai quali costituisce il sottogruppo degli *Helicobacter* con flagelli non rivestiti (Dewhirst *et al.*, 2005).

Il corpo batterico risulta di $0,3-0,5 \times 3-4 \mu\text{m}$ di dimensioni, di forma leggermente curvata e mobile grazie ad un singolo flagello polare (On *et al.*, 2005; Stanley *et al.*, 1994).

Su terreni di coltura agarizzati addizionati di sangue, le colonie assumono un aspetto puntiforme di circa 1 mm di diametro, non pigmentate, traslucide ed alfa emolitiche dopo tre giorni di incubazione a 37°C (On *et al.*, 2005).

La maggior parte dei ceppi producono catalasi, riducono i nitrati e producono idrogeno solforato in Triple Sugar Iron Agar, crescono a 42°C ed in presenza dell'1% di bile. Sono ureasi negativi e non idrolizzano l'indoxyl acetato (On *et al.*, 2005).

H. pullorum è resistente alla cefalotina (32 mg L⁻¹) ed al cefoperazone (64 mg L⁻¹), mentre la maggior parte dei ceppi risulta sensibile all'acido nalidixico (30 mg L⁻¹). La presenza di 2500 UI·L⁻¹ di polimixina B nei terreni di primo isolamento non ne permette la crescita (Atabay *et al.*, 1998; On *et al.*, 2005).

2.2 Fattori di virulenza e patogenesi delle infezioni nel pollo

Nonostante l'associazione tra isolamento di *H. pullorum* e patologia gastroenterica o epatobiliare nell'uomo (Burnens *et al.*, 1994; Steinbrueckner *et al.*, 1997; Fox *et al.*, 1998; Melito *et al.*, 2000; Pozzetto *et al.*, 2000; Pellicano *et al.*, 2004; Rocha *et al.*, 2005) ed epatite vibrionica nelle galline ovaiole (Burnens *et al.*, 1996), pochi studi sono stati eseguiti sui fattori di virulenza di *H. pullorum* (Hynes *et al.*, 2004; Young *et al.*, 2000; Ceelen *et al.*, 2006a) e sulla patogenesi delle infezioni sostenute da questo microrganismo (Neubauer e Hess, 2006; Ceelen *et al.*, 2007).

Come possibili fattori di virulenza per *H. pullorum*, sono stati presi in considerazione i lipopolisaccaridi di membrana (LPS) (Hynes *et al.*, 2004) e la *Cytolethal Distending Toxin* (CDT) (Young *et al.*, 2000; Ceelen *et al.*, 2006a).

I LPS rappresentano importanti fattori di virulenza nei Gram negativi e nell'ambito del genere *Helicobacter* sono implicati nella colonizzazione e nella patogenesi delle infezioni sostenute da *H. pylori* (Hynes *et al.*, 2004).

Hynes *et al.* (2004) dimostrarono, mediante metodi elettroforetici, sierologici e chimici, che i LPS di *H. pullorum* sono inoltre in grado di indurre l'attivazione del *Nuclear Factor-Kappa B* (NF-kappa B) e mostrano una maggiore attività nel lisare gli amebociti di *Limulus* rispetto a quelli di *H. pylori* e di altri *Helicobacter*.

La CDT è stata descritta quale fattore di virulenza in *Escherichia coli* (Johnson e Lior, 1987) ed in altri batteri Gram negativi tra cui *C. jejuni* (Ceelen *et al.*, 2006a) ed esplica la propria azione tossica inducendo l'arresto del ciclo cellulare prima della mitosi di numerosi tipi di cellule, provocando distensione cellulare ed infine morte (Whitehouse *et al.*, 1998).

Young *et al.* (2000) e Ceelen *et al.* (2006a) individuarono il gene *cdtB* codificante per la subunità biologicamente attiva della CDT in tutti gli isolati di *H. pullorum* testati. Solo in un ceppo di *H. pullorum* di origine umana (CCUG 33839) è stato possibile determinare *in vitro*, in cellule Hep-2, attività biologica riferibile all'espressione della CDT (Ceelen *et al.*, 2006a).

Studi di patogenicità *in vivo* di *H. pullorum* sono stati eseguiti in broiler da Neubauer e Hess (2006) e da Ceelen *et al.* (2007), infettando con ceppi umani ed aviari gruppi di animali di circa una settimana di età.

Sia Neubauer e Hess (2006) che Ceelen *et al.* (2007) dimostrarono che *H. pullorum* era in grado di colonizzare rapidamente l'intestino degli animali infettati e di essere eliminato con le feci anche fino ai 42 giorni di vita (età di macellazione). Gli Autori osservarono inoltre che *H. pullorum* esibiva uno spiccato tropismo per la superficie dell'epitelio del'intestino cieco. Nessun animale infettato sperimentalmente manifestò sintomi clinici di malattia o lesioni macroscopiche o microscopiche a livello epatico.

2.3 *Helicobacter pullorum* negli animali e nell'uomo

Dalla disamina della letteratura scientifica, i dati relativi all'isolamento di *H. pullorum* risultano decisamente pochi. Solo recentemente sono state condotte indagini finalizzate a definire la prevalenza di questo microrganismo negli allevamenti avicoli.

H. pullorum fu isolato per la prima volta in Svizzera nel 1993 dal contenuto ciecale di 6 broiler sani su 150 campionati in due allevamenti e dal contenuto ciecale e dal fegato di 9 su 18 galline ovaiole affette da epatite vibriónica (Stanley *et al.*, 1994; Burnens *et al.*, 1996).

In seguito, Atabay e Corry nel 1997 isolarono batteri riferibili a *Campylobacter Like Organisms*, poi identificati come *H. pullorum*, dal contenuto ciecale congelato e da carcasse fresche di 9 su 15 broiler campionati da due differenti allevamenti e prelevati al macello (Atabay *et al.*, 1998).

Successivamente, mediante l'impiego di metodi biomolecolari, *H. pullorum* è stato rilevato nel contenuto ciecale di 8 galline ovaiole su 10 campionate da Tramuta *et al.* (2003) in Italia e nel contenuto ciecale di 10 polli esaminati da Pilon *et al.* (2005) in Francia.

H. pullorum è stato segnalato da Ceelen *et al.* (2006b) nel pappagallo (*Psephotus haematogaster*) e da Van den Bulck *et al.* (2006b) nello stomaco di conigli da laboratorio.

Indagini volte a definire la prevalenza di *H. pullorum* negli allevamenti avicoli sono state condotte da Ceelen *et al.* (2006c) in Belgio e da Nebbia *et al.* (2007) in Italia. Ceelen *et al.* (2006c), impiegando il protocollo di PCR proposto da Stanley *et al.*

(1994), analizzarono il contenuto ciecale di 110 broiler campionati presso 11 differenti allevamenti e trovarono positivi per *H. pullorum* 37 animali (33%) provenienti da 7 differenti allevamenti. Gli autori isolarono dagli stessi campioni *H. pullorum* solo da 16 animali (14%) provenienti da 2 diversi allevamenti.

Nebbia *et al.* (2007), mediante l'analisi delle sequenze di amplificati del 16S rRNA ottenuti direttamente dalla matrice fecale, trovarono positivi per *H. pullorum* 66 polli su 94 (70,2%) ed 11 pernici su 15 (73,3%).

Le prime segnalazioni di *H. pullorum* nell'uomo risalgono al 1994, quando Burnens *et al.*, studiando 387 ceppi batterici originariamente descritti come "CLO", identificarono tra questi 6 ceppi di *H. pullorum*. Tutti i 387 ceppi erano stati isolati da feci di pazienti affetti da patologia enterica e di età compresa fra i 6 e i 60 anni. L'isolamento di *H. pullorum* da feci di pazienti umani con gastroenterite è stato segnalato successivamente in Germania (Steinbrueckner *et al.* 1997), in Canada (Melito *et al.*, 2000), in Olanda (Kuijper *et al.*, 2003) ed in Belgio (Ceelen *et al.*, 2005a).

L'applicazione di metodi biomolecolari ha permesso inoltre di rilevare la presenza del DNA di *H. pullorum* anche nel fegato e nella cistifellea di soggetti umani affetti da colangite sclerosante primaria, colecistite cronica, cirrosi o carcinoma epatocellulare (Fox *et al.*, 1998; Pozzetto *et al.*, 2000; Pellicano *et al.*, 2004; Rocha *et al.*, 2005).

In Francia, i dati di sorveglianza rilevati nel periodo 2004-2005 dall'Institut de Veille Sanitarie (InVS) per le infezioni umane sostenute da *Campylobacter* e microrganismi correlati, hanno evidenziato una bassa prevalenza di *H. pullorum*: su 4176 CLO isolati da soggetti con patologia gastroenterica, solo 2 furono identificati come *H. pullorum* (InVS, 2005: <http://www.invs.sante.fr/surveillance/index.htm>).

Secondo diversi autori la prevalenza di *H. pullorum* nell'uomo è probabilmente sottostimata a causa delle difficoltà legate all'isolamento ed alla corretta identificazione di questo microrganismo (Steinbrueckner *et al.*, 1997; Gibson *et al.*, 1999; Melito *et al.*, 2000). *H. pullorum* presenta, infatti, analogie biochimiche con altre specie del genere *Helicobacter* e con alcuni *Campylobacter* termofili (*C. coli* e *C. lari*) (On *et al.*, 2005). In particolare, *H. pullorum* risulta difficilmente differenziabile fenotipicamente da *H. canadensis*. All'analisi delle sequenze del 16S rRNA le due specie mostrano una differenza di basi pari al 2% ed entrambe le specie sono positive alla PCR descritta da Stanley *et al.* (1994), mentre dal punto di vista fenotipico si distinguono solo per la capacità di *H. canadensis* di idrolizzare l'indoxyl acetato (Fox *et al.*, 2000). Inoltre, *H. canadensis* può condividere con *H. pullorum* gli stessi ospiti (Fox *et al.*, 2000).

Un'indagine mirata a rilevare la prevalenza di *H. pullorum* in feci di pazienti umani sani o clinicamente affetti da problemi gastroenterici è stata condotta da Ceelen *et al.* nel 2005 (Ceelen *et al.*, 2005a) su un numero significativo di pazienti. In questo studio gli autori verificarono, mediante PCR, una positività per *H. pullorum* pari a circa il 4% sia nei soggetti sani sia in quelli affetti da gastroenterite. Diversamente, riuscirono ad isolare *H. pullorum* da un solo paziente affetto da forma gastroenterica.

Nel 2006 Vorobjova *et al.* hanno condotto uno studio sierologico mediante immunoblot su pazienti affetti da patologia epatica di tipo cronico e su individui sani con o senza alti livelli di infezione da *H. pylori*. Gli autori evidenziarono anticorpi anti-*H. pullorum* nel 3,7% dei pazienti affetti da patologia epatica ed in 15 su 106 (14%) individui sani.

Allo stato attuale non esistono ancora chiare evidenze sul potenziale ruolo eziologico di questo microrganismo.

2.4 Tipizzazione e ruolo zoonosico di *Helicobacter pullorum*

Gli unici studi di tipizzazione molecolare di *H. pullorum* sono stati condotti da Gibson *et al.* (1999) e da Ceelen *et al.* (2006c).

Gibson *et al.* (1999) analizzarono 18 ceppi di *H. pullorum* (7 da pollo e 11 da uomo) isolati in differenti aree geografiche mediante due differenti metodi di tipizzazione genotipica: Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) e Pulsed-field Gel Electrophoresis (PFGE). Gli isolati provenienti da animali dello stesso allevamento presentarono un elevato livello di similarità sia in AFLP che in PFGE, indicando la diffusione di un singolo clone tra gli animali dello stesso allevamento, mentre i ceppi non correlati epidemiologicamente mostrarono un elevato grado di diversità genomica tra i diversi ceppi.

Ceelen *et al.* (2006c) analizzarono mediante AFLP 16 ceppi di *H. pullorum* isolati da due differenti gruppi di broiler allevati in Belgio, un ceppo umano isolato sempre in Belgio (Ceelen *et al.*, 2005a) e ceppi ottenuti da collezioni internazionali.

Essi ottennero risultati simili a quelli descritti da Gibson *et al.* (1999): isolati provenienti da animali dello stesso allevamento mostravano profili simili o indistinguibili, mentre isolati provenienti da fonti diverse e di origine geografica differente presentavano profili univoci.

Il grado di diversità genomica intraspecifica osservata in *H. pullorum* è comparabile con quella osservata in altri *Helicobacter* quali *H. pylori* e *H. hepaticus* (Gibson *et al.*, 1999).

H. pylori è uno dei batteri che mostra la maggior diversità genomica intraspecifica. Quando vengono applicati metodi genotipici per analizzare ceppi di *H. pylori* isolati da individui non correlati, i dati indicano che ciascun individuo veicola tendenzialmente il “proprio” ceppo (o addirittura differenti ceppi) ed individui appartenenti alla stessa famiglia possono veicolare differenti ceppi. La struttura di popolazione di *H. pylori* viene per questo definita “quasi-panmictica”, in quanto manca quasi totalmente una struttura clonale in seguito ad un elevatissimo tasso di ricombinazione intraspecifica (Suerbaum e Josenhans, 2007).

Per quanto riguarda *H. hepaticus*, Saunders *et al.* (1997) studiando i profili di PFGE di isolati non correlati epidemiologicamente associati ad epatite in topi da laboratorio provenienti da USA e da Europa, individuarono polimorfismi tra isolati di origine geografica differente ed omogeneità tra isolati provenienti da gruppi di animali della stessa area geografica. Questi dati indicarono una certa struttura clonale della popolazione di *H. hepaticus*, se comparata a quella di *H. pylori*.

Secondo i dati presentati da Gibson *et al.* (1999), la divergenza genomica intraspecifica osservata in *H. pullorum* si pone a cavallo tra quella di *H. pylori* ed *H. hepaticus*, in quanto la clonalità è stata osservata solo per quegli isolati strettamente correlati epidemiologicamente (isolati da animali appartenenti allo stesso allevamento).

La tipizzazione molecolare di *H. pullorum* mediante PFGE e AFLP non ha permesso però di evidenziare correlazioni genotipiche tra gli isolati umani ed animali. Non esiste

ad oggi, quindi, un dato sperimentale che dimostri il passaggio di *H. pullorum* da animale a uomo e viceversa.

Rimane quindi aperta la questione della possibile natura zoonotica delle infezioni umane sostenute da *H. pullorum* e del ruolo del pollo quale sorgente d'infezione. A questo proposito, data l'elevata variabilità intraspecifica di questo microrganismo, al fine di valutare l'eventuale passaggio tra animale e uomo, sarebbe necessario confrontare ceppi isolati da animali e da individui strettamente correlati epidemiologicamente.

PARTE SPERIMENTALE

PRESENTAZIONE

Sebbene negli ultimi anni siano state numerose le segnalazioni di *H. pullorum* quale possibile agente d'infezione nell'uomo, il ruolo zoonosico di questo microrganismo non è ancora stato chiarito ed i dati riguardanti la diffusione di *H. pullorum* in popolazioni animali e nell'uomo risultano ancora carenti. Al fine di apportare un contributo scientifico a questa tematica, nell'ambito del Dottorato di Ricerca in "Epidemiologia e Controllo delle Zoonosi" ho condotto un'attività di ricerca su *H. pullorum* volta a raggiungere i seguenti:

1. ottimizzare il metodo di isolamento di *H. pullorum* da matrice fecale;
2. determinare la prevalenza di *H. pullorum* in allevamenti di diversa tipologia di pollo e di tacchino;
3. isolare *H. pullorum* da pazienti umani affetti da quadri di gastroenterite al fine di valutare le eventuali relazioni genetiche tra ceppi umani ed animali;
4. caratterizzare gli isolati al fine di aumentare i dati fenotipici relativi alla specie;
5. tipizzare genotipicamente gli isolati di *H. pullorum* al fine di determinare eventuali correlazioni genetiche;
6. valutare la sensibilità e la resistenza degli isolati di *H. pullorum* a diversi antibiotici mediante la determinazione della Concentrazione Minima Inibente (CMI);
7. definire i meccanismi molecolari alla base della resistenza dei fluorochinoloni.

Tale argomento di ricerca è stato scelto, oltre che per i suoi risvolti in ambito veterinario e di sanità pubblica, anche alla luce dell'esperienza maturata in quasi

trent'anni nel Laboratorio di Batteriologia del Dipartimento Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale dell'Università di Bologna dove sono stato inserito, nonché in seguito alla richiesta avanzata dal Dipartimento di Scienze degli Alimenti dell'Università di Bologna, nelle persone del Prof. Franchini e del Dr. Manfreda, per collaborare su questo specifico argomento nell'ambito del progetto europeo: STRP - Food Quality and Safety – Priority 5 “*Control of the intestinal flora ecology in poultry for ensuring the products safety for human consumers*”, denominato POULTRYFLUORGUT.

Data la molteplicità delle attività di ricerca svolte ho ritenuto opportuno suddividere la presente tesi in diversi capitoli dedicati alle singole linee di ricerca affrontate, in modo da facilitarne l'esposizione e la lettura.

CAPITOLO 1

Ottimizzazione dei metodi di isolamento di *Helicobacter pullorum* da matrice policontaminata

1.1	Introduzione	37
1.2	Valutazione della produttività di diversi terreni di coltura agarizzati impiegati nell'isolamento di <i>H. pullorum</i>	39
1.3	Definizione di un protocollo d'isolamento di <i>H. pullorum</i> mediante l'impiego di terreni selettivi agarizzati	43
1.4	Definizione di un protocollo d'isolamento di <i>H. pullorum</i> mediante l'impiego del metodo della membrana filtrante	47
1.5	Validazione e confronto dei due diversi metodi d'isolamento di <i>H. pullorum</i> da matrici policontaminati mediante l'impiego di campioni di contenuto ciecale di broiler e galline ovaiole	53
1.6	Discussione	54

1.1 Introduzione

Dal punto di vista colturale gli *Helicobacter* sono batteri esigenti in quanto richiedono particolari terreni di coltura e lunghi periodi d'incubazione in particolari condizioni di microaerofilia; secondo diversi autori (Taneera *et al.*, 2002; On *et al.*, 2005) sarebbero queste le cause che portano a sottostimare le infezioni sostenute da questi microrganismi.

Le informazioni sulle modalità d'isolamento di *Helicobacter pullorum* da matrici policontaminate sono limitate e non sempre concordanti (Atabay e Corry, 1997; Atabay *et al.*, 1998; On *et al.*, 2005; Ceelen *et al.*, 2006c).

È stato quindi ritenuto opportuno, prima di iniziare un'indagine sulla prevalenza di *H. pullorum* negli allevamenti avicoli italiani, eseguire una serie di prove finalizzate a definire quale fosse il metodo d'isolamento più sensibile da impiegare.

Le diverse attività sono state cronologicamente condotte come di seguito riportato:

- valutazione della produttività di diversi terreni di coltura agarizzati;
- valutazione della produttività di un terreno colturale agarizzato addizionato con diverse concentrazioni di antibiotico;
- definizione di un protocollo di isolamento di *H. pullorum* da matrice policontaminata mediante l'impiego di terreni selettivi agarizzati;
- definizione di un protocollo di isolamento di *H. pullorum* da matrice policontaminata mediante l'impiego del metodo della membrana filtrante;
- validazione e confronto dei due diversi protocolli.

Riguardo le condizioni di atmosfera impiegabili per l'isolamento degli *Helicobacter*, per tutti i test da noi eseguiti si è deciso di utilizzare la microaerofilia arricchita di idrogeno. Le condizioni microaerofile che permettono la crescita della maggior parte delle specie, prevedono tipicamente CO₂/N₂/O₂/H₂ in proporzione 5:88:5:2-7 (On *et al.*, 2005). Per ottenere questo tipo di atmosfera è stato utilizzato il metodo descritto da Bolton *et al* (1992). In breve, utilizzando una giara per atmosfera modificata di 3,5 L, si crea un vuoto pari a -0,6 bar che viene successivamente sostituito da una miscela di gas per anaerobiosi (CO₂/H₂/N₂ in proporzione 10:10:80).

Diversi sono i metodi utilizzabili per l'isolamento di *Helicobacter*, ma nessuno risulta migliore degli altri. Indipendentemente dal tipo di campione considerato, l'isolamento può essere ottimizzato mediante l'uso contemporaneo di metodi selettivi e non selettivi associati a lunghi periodi d'incubazione (3-10 giorni) in atmosfera ricca di idrogeno (On *et al.*, 2005). In ogni caso il successo dell'isolamento di *Helicobacter* è strettamente legato alla processazione di campioni molto freschi (On *et al.*, 2005). I terreni di arricchimento normalmente impiegati per l'isolamento di *Campylobacter* termofili da campioni non freschi hanno raramente lo stesso effetto sugli *Helicobacter* enteroepatici e non sono quindi utilizzabili per l'isolamento di quest'ultimi specialmente se applicati a materiale fecale, spesso contaminato da *Campylobacter* (On *et al.*, 2005).

1.2 Valutazione della produttività di diversi terreni di coltura agarizzati impiegati nell'isolamento di *H. pullorum*

Per l'isolamento e la coltura di *H. pullorum* sono stati impiegati in passato diversi terreni di coltura. On e Holmes (1991a) raccomandano il *Nutrient* agar N°2 addizionato del 5% di sangue quale terreno da impiegarsi per le prove di crescita di tutti i *Campylobacter* e gli *Helicobacter*, in quanto dimostratosi sperimentalmente più produttivo rispetto ai terreni *Sheep Blood* agar e *Brucella* agar.

Atabay *et al.* (1998) hanno utilizzato, per l'isolamento di *H. pullorum*, il terreno *Sheep Blood* agar sia impiegandolo nella tecnica della membrana filtrante, sia come base nei terreni selettivi.

Ceelen *et al.* (2006c), in un'indagine finalizzata a definire la prevalenza di *H. pullorum* negli allevamenti di pollo, impiegarono la tecnica di Steele e McDermott (1984) utilizzando il terreno *Brain Heart Infusion* agar addizionato del 10% di sangue equino.

Il *Brucella* agar (BD) addizionato del 5% di sangue ovino è il terreno routinariamente utilizzato presso il nostro laboratorio per l'isolamento e la coltura di *Helicobacter* e *Campylobacter* (Rossi *et al.*, 2007). Jalava *et al.* (1998) segnalano che questo terreno non era adatto per la coltivazione di alcune specie di *Helicobacter* e On *et al.* (2005) imputarono questo fenomeno alla presenza di bisolfito di sodio nella composizione.

Sulla base di quanto riportato in letteratura è stata confrontata la produttività, per *H. pullorum*, dei seguenti quattro terreni di coltura:

1. BBL-Brucella Broth (BD) + 1,5% Bacto-Agar (BD) + 5% di sangue ovino (**BR**);
2. Difco-Brain Heart Infusion (BD) + 1,5% Bacto-Agar (BD) + 5% di sangue ovino (**BHI**);
3. Nutrient Broth N°2 (Oxoid) + 1,5% Bacto-Agar (BD) + 5% sangue ovino (**NA**);
4. Sheep Blood Agar (Oxoid) + 5% sangue ovino (**SBA**).

La produttività dei diversi terreni è stata valutata utilizzando il ceppo tipo di *H. pullorum* (CIP104787^T).

Il ceppo tipo è stato acquistato liofilizzato dall'Institut Pasteur (CIP). Seguendo le indicazioni del fornitore, il ceppo è stato reidratato con distillata sterile, seminato su Columbia Agar (BD) + 5% di sangue ovino, quindi incubato in microaerofilia arricchita d'idrogeno a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ per 4 giorni.

Una volta vivificato, il ceppo è stato sospeso in Trypticase Soy Broth (BD) + 10% glicerolo (Sigma) (Taneera *et al.*, 2002) e congelato in azoto liquido.

Le prove di produttività dei diversi terreni sono state eseguite applicando il seguente protocollo operativo:

- preparare 48 ore prima della prova i diversi terreni di coltura seguendo le indicazioni delle ditte produttrici utilizzando lo stesso lotto di sangue ovino;
- allestire una sospensione di *H. pullorum* CIP104787^T in soluzione fisiologica sterile con una torbidità pari al valore 0,5 della scala di McFarland ($\approx 1,5\times 10^8$)

UFC mL⁻¹) partendo da una coltura di 48 ore su Columbia Agar (BD) + 5% di sangue ovino;

- diluire serialmente in base 10 la sospensione batterica fino alla diluizione 10⁻⁶;
- seminare per spatolamento 0,1 mL delle diluizioni 10⁻⁴, 10⁻⁵ e 10⁻⁶ sulla superficie delle piastre dei diversi terreni di coltura (BR, BHI, NA, SBA);
- eseguire, per ciascun terreno, la semina in triplo;
- incubare le piastre a 37±1°C in microaerofilia;
- eseguire le operazioni che vanno dall'allestimento della sospensione batterica all'incubazione in microaerofilia in un intervallo di tempo non superiore a 20 minuti;
- eseguire la conta e valutare la morfologia delle colonie di *H. pullorum* CIP104787^T dopo le prime 48 ore di incubazione, quindi nei tre giorni successivi.

I risultati delle conte eseguite sui quattro diversi terreni di coltura sono riportati nella tabella 1. I valori riportati in tabella rappresentano la media aritmetica del numero di colonie ottenute per ogni diluizione, per uno stesso terreno, nelle tre repliche eseguite e la relativa deviazione standard; i valori sono stati approssimati all'unità.

SBA è risultato meno produttivo rispetto agli altri terreni saggiati. Gli altri terreni di coltura hanno mostrato uno stesso livello di produttività, con valori di UFC mL⁻¹ comparabili a quelli attesi ($\approx 1,5 \times 10^8$ UFC mL⁻¹).

Tabella 1. Conte batteriche eseguite su quattro diversi terreni di coltura. I valori riportati rappresentano la media aritmetica del numero di colonie ottenute per ogni diluizione, per uno stesso terreno, nelle tre repliche eseguite e la relativa deviazione standard; i valori sono stati approssimati all'unità. Per ottenere il numero di UFC mL⁻¹, moltiplicare il valore indicato per dieci volte il valore della diluizione di riferimento.

Giorno di lettura	Diluizione	Terreni di coltura			
		BR	BHI	NA	SBA
2°	10 ⁻⁴	-	-	-	-
	10 ⁻⁵	-	-	-	-
	10 ⁻⁶	-	-	-	-
3°	10 ⁻⁴	> 200	> 200	> 200	-
	10 ⁻⁵	140 ± 20	122 ± 5	135 ± 10	-
	10 ⁻⁶	< 20	< 20	< 20	-
4°	10 ⁻⁴	> 200	> 200	> 200	-
	10 ⁻⁵	145 ± 8	125 ± 5	147 ± 2	-
	10 ⁻⁶	< 20	< 20	< 20	-
5°	10 ⁻⁴	> 200	> 200	> 200	142 ± 8
	10 ⁻⁵	145 ± 8	125 ± 5	147 ± 2	27 ± 7
	10 ⁻⁶	< 20	< 20	< 20	-

- = nessuna crescita

Le variazioni del numero delle colonie osservate nei terreni BR, BHI e NA non sono state considerate significative.

La crescita di *H. pullorum* era osservabile su BR, BHI e NA già in terza giornata, sebbene le dimensioni delle colonie fossero al limite della visibilità; tra la quarta e la quinta giornata, per tutti i diversi terreni, non è stata evidenziata una variazione numerica delle colonie.

Dopo cinque giorni d'incubazione non sono state registrate differenze morfologiche e dimensionali delle colonie di *H. pullorum* cresciute sui tre terreni di coltura BR, NA e BHI.

Sebbene la produttività dei terreni BR, NA e BHI sia risultata identica, è stato deciso di utilizzare in tutte le prove successive il *Brucella* agar, essendo questo terreno già in uso da lungo tempo presso il nostro laboratorio per l'isolamento e la coltura di *Helicobacter* e *Campylobacter*.

Come sottolineano Corry *et al.* (1995) l'esperienza dell'operatore, intesa come capacità di discriminare le diverse tipologie delle colonie batteriche nelle piastre di primo isolamento, incide significativamente sulla capacità di fornire dati corretti sulla prevalenza di *Campylobacter* ed *Helicobacter*.

1.3 Definizione di un protocollo d'isolamento di *H. pullorum* mediante l'impiego di terreni selettivi agarizzati

I terreni selettivi impiegati per l'isolamento di *Campylobacter* da matrici policontaminate sono ottenuti mediante l'aggiunta, ad un terreno base, di supplementi costituiti da uno o più antibiotici. Il primo supplemento selettivo, formulato da Skirrow (1977), conteneva vancomicina, trimethoprim, polimixina B ed anfotericina B. In seguito sono stati introdotti altri supplementi diversamente formulati, quali: il supplemento di Blaser costituito da vancomicina, trimethoprim, polimixina B, cefalotina ed anfotericina B (Blaser *et al.*, 1979); il supplemento CVA costituito da cefoperazone, vancomicina ed anfotericina B (Reller *et al.*, 1983); cefoperazone in Charcoal Cefoperazone Deoxycholate Agar (CCDA) (Bolton *et al.*, 1984); il supplemento CAT costituito da cefoperazone, teicoplanina ed anfotericina B (Aspinall *et al.*, 1993).

Per l'isolamento degli *Helicobacter* vengono più frequentemente impiegati i supplementi di Skirrow (1977) e di Blaser *et al.* (1979) (On *et al.*, 2005) ma sono sconsigliati per l'isolamento di *H. pullorum*, in quanto Atabay *et al.* (1998) hanno dimostrato che la presenza di 2500 UI·mL⁻¹ di polimixina B nel terreno di coltura impedisce la crescita di questo microrganismo.

Dalla disamina della letteratura risulta che gli isolamenti di *H. pullorum* su terreni selettivi agarizzati sono stati ottenuti utilizzando i supplementi CVA (cefoperazone 32 mg mL⁻¹; vancomicina 10 mg mL⁻¹; anfotericina B)(Stanley *et al.*, 1994; Burnens *et al.*, 1996) e CAT (cefoperazone 8 mg mL⁻¹; teicoplanina 4 mg mL⁻¹; anfotericina B) (Corry e Atabay, 1997). Sull'efficacia di questi supplementi sussistono però pareri discordanti (Atabay *et al.*, 1998).

La prima fase, necessaria per definire un protocollo d'isolamento di *H. pullorum* da una matrice policontaminata mediante l'impiego di terreni selettivi, è stata quella di valutare la produttività per *H. pullorum* in due diversi terreni di coltura (**BR** e **BHI**) addizionati con il supplemento antibiotico **CAT** a due diverse concentrazioni di cefoperazone: una a 8 mg mL⁻¹ (**CAT8**) l'altra a 32 mg mL⁻¹ (**CAT32**).

Le prove di produttività dei diversi terreni selettivi sono state eseguite applicando il seguente protocollo operativo:

- preparare, 48 ore prima della prova, i diversi terreni di coltura seguendo le indicazioni delle ditte produttrici ed utilizzando lo stesso lotto di sangue ovino;
- allestire una sospensione di *H. pullorum* CIP104787^T in soluzione fisiologica sterile con una torbidità pari al valore 0,5 della scala di McFarland ($\approx 1,5 \times 10^8$

UFC mL⁻¹) partendo da una coltura di 48 ore su Columbia Agar (BD) + 5% di sangue ovino;

- diluire serialmente in base 10 la sospensione batterica fino alla diluizione 10⁻⁶;
- seminare per spatolamento 0,1 mL delle diluizioni 10⁻⁴, 10⁻⁵ e 10⁻⁶ sulla superficie delle piastre dei diversi terreni di coltura selettivi (BR+CAT8, BR+CAT32 , BHI +CAT8, BHI +CAT32);
- eseguire, per ciascun terreno, la semina (conta) in triplo;
- incubare le piastre a 37±1°C in microaerofilia;
- eseguire le operazioni che vanno dall'allestimento della sospensione batterica all'incubazione in microaerofilia in un intervallo di tempo non superiore a 20 minuti;
- eseguire la conta e valutare la morfologia delle colonie di *H. pullorum* CIP104787^T dopo cinque giorni di incubazione.

Contestualmente ai terreni selettivi, sono stati seminati anche i terreni **BR** e **BHI** non supplementati con miscela antibiotica.

I risultati delle conte eseguite sui diversi terreni selettivi sono riportati nella tabella 2. I valori riportati rappresentano la media aritmetica del numero di colonie di *H. pullorum* rilevate nelle tre repliche, approssimati all'unità. La conta è stata eseguita dopo 5 giorni di incubazione sulle piastre seminate con la diluizione 10⁻⁵.

Tabella 2. Conte batteriche eseguite sui diversi terreni selettivi e sugli stessi terreni non supplementati con miscela antibiotica. I valori riportati rappresentano la media aritmetica del numero di colonie di *H. pullorum* rilevate nelle tre repliche, approssimati all'unità. La conta è stata effettuata dopo 5 giorni di incubazione sulle piastre seminate con la diluizione 10^{-5} .

Tipologia terreno	BR	BR +CAT8	BR + CAT32
Media n° colonie	160	172	165
Tipologia terreno	BHI	BHI +CAT8	BHI+CAT32
Media n° colonie	130	142	134

Dopo cinque giorni d'incubazione non sono state registrate differenze morfologiche e dimensionali delle colonie di *H. pullorum* cresciute sui terreni selettivi e sugli stessi terreni di coltura non supplementati con miscela antibiotica.

I risultati ottenuti hanno permesso di stabilire che le due diverse miscele antibiotiche saggate (CAT8 e CAT32) non interferivano sulla crescita del battere e che la produttività dei due diversi terreni (BR e BHI) era simile.

Sulla base di questi risultati è stato definito un protocollo, che viene di seguito riportato, per l'isolamento di *H. pullorum* da una matrice policontaminata mediante terreno selettivo solido **BR+CAT32**.

Protocollo per l'isolamento di *H. pullorum* da contenuto ciecale mediante terreno selettivo solido BR+CAT32:

- prelevare, evitando cross-contaminazioni, circa 5g del contenuto ciecale di un animale e diluirlo in un ugual volume di soluzione fisiologica;
- omogeneizzare il campione agitandolo su vortex per 2 minuti;

- seminare mediante ansa calibrata 10 µl del campione su una o più piastre del terreno selettivo **BR-CAT32**;
- incubare le piastre in microaerofilia a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ per sette giorni;
- leggere le piastre giornalmente dopo le prime 72 ore di incubazione;
- clonare su BR eventuali colonie riconducibili ad *H. pullorum*;
- provvedere all'identificazione delle colonie selezionate.

1.4 Definizione di un protocollo d'isolamento di *H. pullorum* mediante l'impiego del metodo della membrana filtrante

I metodi non selettivi impiegati per l'isolamento di *Campylobacter* e *Helicobacter*, si basano sulla capacità di questi batteri di attraversare membrane filtranti grazie alle loro dimensioni ed alla loro spiccata mobilità.

Il metodo della membrana filtrante è stato impiegato per la prima volta da Steele e McDermott nel 1984 per l'isolamento di *C. jejuni* da campioni di feci umani.

L'impiego di questa tecnica finalizzata all'isolamento di *H. pullorum* da matrici policontaminate è stato utilizzato da Atabay *et al.* (1998) in Inghilterra e da Ceelen *et al.* (2006c) in Belgio.

Atabay *et al.* (1998) hanno operato inoculando 6 o 4 gocce (≈ 120 o $80 \mu\text{l}$) di una sospensione di un campione policontaminato su una membrana filtrante di cellulosa di diametro 47 mm e $0,65 \mu\text{m}$ di porosità depositata su una piastra di *Sheep Blood Agar*. La piastra era quindi mantenuta a temperatura ambiente in condizioni di aerobiosi per un'ora prima di rimuovere il filtro e seminare con un'ansa il liquido filtrato su tutta la

superficie della piastra. Il terreno di coltura era quindi incubato in microaerofilia arricchita con idrogeno a $37\pm 1^\circ\text{C}$ per diversi giorni.

Ceelen *et al.* (2006c), diversamente, diluivano 200 mg di contenuto ciecale di pollo in 400 μl di un diluente così formulato: 100 μl di Brain Heart Infusion, 300 μl di siero di cavallo sterile inattivato e 0,03 g di glucosio. Circa 300 μl del campione diluito erano poi inoculati su una membrana filtrante di cellulosa di 47 mm di diametro e 0,45 μm di porosità, depositata sulla superficie di una piastra di *Brain Heart Infusion Agar* + 10% sangue equino. Le piastre erano mantenute in un'atmosfera al 5% CO_2 a 37°C per un'ora prima di rimuovere il filtro e seminare con un'ansa il liquido filtrato su tutta la superficie della piastra. Il terreno di coltura era quindi incubato in microaerofilia arricchita con idrogeno a $37\pm 1^\circ\text{C}$.

I due protocolli d'isolamento differivano per i seguenti punti:

- (i) il tipo ed il volume del diluente utilizzato per allestire l'inoculo;
- (ii) l'atmosfera in cui venivano mantenuti i terreni nell'intervallo di tempo tra il deposito del campione sulla membrana filtrante e la successiva rimozione di quest'ultima;
- (iii) la porosità delle membrane filtranti utilizzate.

Al fine di mettere a punto un protocollo volto all'isolamento di *H. pullorum* da matrice policontaminata mediante l'impiego di membrane filtranti, è stato deciso di eseguire diverse prove al fine di valutare quanto le differenze tra i due protocolli sopra descritti potessero interferire sulla sensibilità del metodo. Vengono di seguito sinteticamente riportate le attività svolte.

(i) L'esecuzione di una serie di prove ha permesso di evidenziare come il diluente indicato da Ceelen *et al* (2006c) apportasse i seguenti vantaggi:

- a) la possibilità, da ricondurre alla maggior viscosità del diluente, di depositare sulla membrana filtrante un volume di inoculo quattro volte superiore a quello utilizzato da Atabay;
- b) una maggiore efficienza di filtrazione;
- c) una riduzione della mobilità di *Campylobacter* imputabile ad una minor disponibilità di acqua libera sulla superficie dell'agar.

(ii) Sebbene non sia stata ancora definita la resistenza di *H. pullorum* all'ossigeno atmosferico, è noto che l'esposizione dei batteri microaerofili ad alte concentrazioni di ossigeno per intervalli di tempo superiori ai 20-30 minuti ne riduce la vitalità e la mobilità. Le prove da noi condotte in laboratorio hanno dimostrato come il mantenimento delle piastre, nell'intervallo di tempo tra il deposito del campione sulla membrana filtrante e la sua successiva rimozione, in condizioni di microaerofilia piuttosto che in aerobiosi od in atmosfera arricchita al 5% di CO₂, aumentasse la possibilità di isolare *H. pullorum*.

(iii) Per determinare la percentuale di recupero di *H. pullorum* impiegando membrane filtranti a diversa porosità (0,45 µm e 0,65 µm) sono state effettuate delle prove impiegando sospensioni di *H. pullorum* CIP104787^T a diversa concentrazione.

La percentuale di recupero è stata determinata applicando il protocollo di seguito riportato:

- partendo da una coltura di 48 ore su BR di *H. pullorum* CIP104787^T, allestire una sospensione batterica con una torbidità pari al valore 0,5 della scala di McFarland ($\approx 1,5 \times 10^8$ UFC mL⁻¹) in un diluente sterile così formulato: 2,5 ml di Brain Heart Infusion, 7,5 ml di siero di cavallo sterile inattivato e 0,75g di glucosio;
- utilizzando lo stesso diluente impiegato al punto 1, diluire serialmente in base 10 la sospensione batterica fino ad ottenere la diluizione 10⁻⁶;
- depositare sulla superficie di un numero sufficiente di piastre di BR una membrana filtrante sterile di acetato di cellulosa diametro di 47 mm (Millipore), porosità 0,45 µm ed in altrettante piastre una membrana filtrante con porosità 0,65 µm, evitando la formazione di bolle d'aria sotto i filtri;
- depositare sulla membrana filtrante 300 µl delle diluizioni 10⁻⁴, 10⁻⁵ e 10⁻⁶ della sospensione batterica;
- eseguire per ogni tipo di filtro e per tutte le diluizioni la semina in triplo;
- distribuire l'inoculo su tutta la superficie della membrana, facendo attenzione a non superare i bordi della membrana stessa;
- incubare le piastre (senza girarle) a 37 ±1°C in microaerofilia per 1 ora;
- rimuovere il filtro con una pinza sterile e seminare con un'ansa il liquido filtrato su tutta la superficie della piastra;
- incubare le piastre a 37±1°C in microaerofilia;
- eseguire una conta batterica su terreno BR della sospensione iniziale di *H. pullorum* finalizzata ad accertare la percentuale di recupero;

- provvedere alla lettura delle piastre ed alla conta delle colonie di *H. pullorum*, a partire dal secondo giorno di incubazione e nei successivi tre giorni.

I risultati di questa prova sono riportati nella tabella 3.

Il numero di batteri inoculati è stato definito sulla base della conta delle diverse diluizioni di *H. pullorum* su BR. La percentuale di recupero è stata calcolata come la media aritmetica delle conte delle tre repliche sul numero di colonie inoculate.

I risultati indicano che l'impiego di una membrana filtrante da 0,65 µm permette una maggiore percentuale di recupero di *H. pullorum* rispetto a quella da 0,45 µm. Dopo cinque giorni di incubazione, la % di recupero mediante la membrana da 0,65µm risultava del 2,85%, mentre quella da 0,45 µm era solo del 0,025%.

Tabella 3. Numero di colonie rilevate su BR dopo 2, 3, 4, e 5 giorni di incubazione riferito alle tre repliche per ciascun filtro: 0,45 µm e 0,65µm. La percentuale di recupero è stata calcolata come la media aritmetica delle conte delle tre ripetizioni sul numero di colonie inoculate.

Giorno di incubazione	Diluizione seminata	Numero batteri inoculati	Membrana 0,45µm				Membrana 0,65µm			
			Prove			% recupero	Prove			% recupero
			1	2	3		1	2	3	
2gg	10 ⁻⁴	4000	-	-	-	0	-	-	-	0
	10 ⁻⁵	400	-	-	-	0	-	-	-	0
	10 ⁻⁶	40	-	-	-	0	-	-	-	0
3gg	10 ⁻⁴	4000	-	-	-	0	98	90	95	2,35%
	10 ⁻⁵	400	-	-	-	0	24	18	22	5,33%
	10 ⁻⁶	40	-	-	-	0	3	2	2	5,83%
4gg	10 ⁻⁴	4000	-	-	-	0	115	110	118	2,85%
	10 ⁻⁵	400	-	-	-	0	30	23	34	7,25%
	10 ⁻⁶	40	-	-	-	0	5	7	4	13,3%
5gg	10 ⁻⁴	4000	1	-	2	0,025%	115	110	118	2,85%
	10 ⁻⁵	400	-	-	-	0	30	23	34	7,25%
	10 ⁻⁶	40	-	-	-	0	5	7	4	13,3%

- = nessuna colonia rilevata

Sulla base dei risultati ottenuti è stato definito un protocollo per l'isolamento di *H. pullorum* da contenuto ciecale di pollo mediante l'impiego di membrana filtrante, che viene di seguito riportato.

Protocollo d'isolamento di *H. pullorum* da contenuto ciecale di pollo mediante l'impiego di membrana filtrante:

- prelevare, evitando cross-contaminazioni, circa 5 g del contenuto dell'intestino cieco di un animale e sospenderlo in un ugual volume di soluzione fisiologica sterile;
- omogeneizzare le feci agitandole su vortex per 1 minuto;
- prelevare 100 µl della sospensione di feci e diluirli con 400 µl di un diluente così formulato: 100 µl di Brain Heart Infusion (BD) sterile, 300 µl di siero di cavallo sterile inattivato e 0,03g di glucosio (Sigma);
- omogeneizzare il campione su vortex per 2 minuti;
- depositare una membrana filtrante sterile di acetato di cellulosa con diametro 47 mm, porosità 0,65 µm (Millipore) sulla superficie di una piastra di *Brucella Agar* avendo cura di evitare la formazione di bolle d'aria sotto il filtro;
- depositare nel centro della membrana filtrante 300 µl del campione da esaminare;
- distribuire l'inoculo su tutta la superficie della membrana facendo attenzione a non superare i bordi della membrana stessa;

- incubare le piastre (senza girarle) a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ in microaerofilia con idrogeno per 1 ora;
- rimuovere il filtro con una pinza sterile e distribuire con un'ansa il liquido filtrato su tutta la superficie della piastra;
- incubare a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ in microaerofilia;
- leggere le piastre giornalmente dopo le prime 48 ore di incubazione;
- clonare su BR eventuali colonie riconducibili ad *H. pullorum*;
- provvedere all'identificazione delle colonie selezionate.

1.5 Validazione e confronto dei due diversi metodi d'isolamento di *H. pullorum* da matrici policontaminate mediante l'impiego di campioni di contenuto ciecale di broiler e galline ovaiole

Materiali e Metodi

Campionamento

Al fine di validare e confrontare i due diversi metodi d'isolamento di *H. pullorum* da matrice fecale, sono stati campionati presso macelli avicoli 32 intestini pollo (4 animali per ogni allevamento). In totale sono stati selezionati animali provenienti da 6 allevamenti di broiler e 2 allevamenti di galline ovaiole.

Da ciascun animale era prelevato, dopo eviscerazione, l'intero pacchetto intestinale, che era riposto in un sacchetto di plastica poi mantenuto a temperatura di refrigerazione e trasportato in laboratorio entro quattro ore dal prelievo.

Isolamento

Il contenuto ciecale era processato applicando i due diversi protocolli d'isolamento per *H. pullorum* descritti a pagina 46 e a pagina 52.

Identificazione di H. pullorum

Una colonia sospetta per ciascun campione è stata presuntivamente identificata come *H. pullorum* utilizzando il protocollo di Polymerase Chain Reaction (PCR) descritto da Stanley *et al.* (1994) impiegando la seguente coppia di primer:

- PullFW 5'ATGAATGCTAGTTGTTGTCAG3';
- PullRW 5' GATTGGCTCCACTTCACA 3'.

L'estrazione della DNA totale dei batteri e l'esecuzione della PCR sono stati effettuati utilizzando il Kit REDEExtract-N-Amp Tissue PCR (Sigma).

Risultati

L'impiego dei terreni selettivi ha consentito di isolare *H. pullorum* dal 50% campioni: 10 campioni di broiler e 6 campioni di galline ovaiole. Tutti gli allevamenti sono risultati positivi. Il mancato isolamento dal 50% dei campioni era imputabile alla crescita di flora enterica contaminante che invadeva tutta la superficie della piastra.

L'impiego del metodo della membrana filtrante ha permesso invece di isolare *H. pullorum* dal 100% dei campioni.

1.6 Discussione

Le attività descritte in questo capitolo hanno permesso di definire due protocolli per l'isolamento di *H. pullorum* da matrici policontaminate: il primo basato sull'utilizzo di terreni selettivi, il secondo sull'utilizzo di membrane filtranti.

Sebbene la fase di validazione abbia dimostrato che entrambi i metodi testati permettevano di isolare *H. pullorum* da una matrice policontaminata, è emerso che il metodo della membrana filtrante è significativamente più sensibile. Questo metodo è quindi lo strumento più adatto da utilizzarsi in uno studio di prevalenza di *H. pullorum* basato sull'isolamento di questo microrganismo da una matrice policontaminata.

Il vantaggio derivante dall'impiego della membrana filtrante, oltre a mostrare una maggiore sensibilità, è quello di ottenere ceppi batterici più idonei per lo studio dell'antibiotico-resistenza, in quanto elimina la possibile interferenza degli antibiotici contenuti nei terreni selettivi.

È stato definito inoltre come, in condizioni sperimentali, da una matrice non policontaminata il protocollo di isolamento mediante l'impiego di membrane filtranti abbia una sensibilità tale da permettere l'isolamento di *H. pullorum* a concentrazioni pari a circa 10^3 UFC·g⁻¹. Per campioni con livelli di contaminazione da *H. pullorum* inferiori dovranno essere impiegati metodi più sensibili, quale ad esempio la PCR.

Sono state avviate attualmente presso il nostro laboratorio attività finalizzate allo sviluppo e la messa a punto di metodi genotipici per la determinazione diretta di *H. pullorum* mediante PCR da matrice fecale.

CAPITOLO 2

Isolamento di *Helicobacter pullorum* da contenuto ciecale di broiler, galline ovaiole, tacchini e struzzo, caratterizzazione fenotipica e tipizzazione genotipica degli isolati

2.1 Introduzione	57
2.2 Materiali e metodi	59
2.3 Risultati	73
2.4 Discussione	81

2.1 Introduzione

Come già anticipato nella parte generale, sono riportati in letteratura solo due studi sulla prevalenza di *H. pullorum* negli allevamenti avicoli (Ceelen *et al.*, 2006c; Nebbia *et al.*, 2007) e i dati biochimici e di tipizzazione genotipica per questa specie sono disponibili solo per un numero limitato di ceppi (Stanley *et al.*, 1994; Atabay *et al.*, 1998; On *et al.*, 1995; Gibson *et al.*, 1999; Ceelen *et al.*, 2006c).

Le attività di ricerca presentate in questo capitolo hanno quindi la finalità di aumentare i dati relativi a questa specie di *Helicobacter*, provvedendo a determinarne la prevalenza in allevamenti nazionali di pollo e di tacchino di diversa tipologia, di caratterizzare biochimicamente gli isolati e definirne le correlazioni genetiche mediante tipizzazione molecolare.

Questa indagine è stata svolta nell'ambito del progetto europeo POULTRYFLUORGUT. Tra gli obiettivi di questo progetto, c'era quello di definire la prevalenza di differenti specie batteriche associate alla flora enterica delle specie avicole, tra cui *H. pullorum*. È da sottolineare come nell'ambito del progetto europeo, il piano di campionamento risultasse originariamente esteso ad un numero maggiore di allevamenti rispetto a quanti in realtà ne siano stati campionati in questa indagine. Tale ridimensionamento è da imputarsi all'insorgenza di focolai di Influenza Aviaria verificatisi nel corso del 2006 ed alle relative restrizioni sanitarie che hanno limitato le normali attività di campionamento.

La definizione della prevalenza di un microrganismo in una popolazione è strettamente legata all'impiego di un metodo d'isolamento di cui è nota la sensibilità e

di un protocollo d'identificazione in grado di identificare correttamente l'isolato. Il metodo d'isolamento da noi impiegato per la definizione della prevalenza di *H. pullorum* in allevamenti avicoli italiani, è stato quello messo a punto e descritto nel precedente capitolo di questa tesi. L'identificazione degli isolati è stata eseguita applicando un protocollo genotipico basato sulle sequenze del 16S rRNA proposto da Stanley *et al.* (1994) e da Fox *et al.* (2000). Su un numero significativo di microrganismi è stato inoltre applicato, nell'ambito di un approccio polifasico, anche lo studio del profilo proteico in 1D SDS PAGE, al fine di verificare l'identificazione genotipica degli isolati. Questo metodo impiegato nel passato negli studi tassonomici di molte specie batteriche, rimane ancora oggi uno strumento valido per la classificazione delle specie all'ordine degli *Epsilonproteobacteria* (Vandamme *et al.*, 1991).

Per la caratterizzazione biochimica degli isolati di *H. pullorum*, ci si è attenuti strettamente alle indicazioni di On *et al.* (1996) che hanno definito, per gli epsilonproteobatteri, un pannel di prove biochimiche basate su protocolli standard (On e Holmes, 1991a; 1991b; 1992) sviluppati al fine di rendere confrontabili i dati prodotti da diversi laboratori.

Per lo studio della variabilità intraspecifica in *H. pullorum* è stato definito, in collaborazione con l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, sezione di Padova un protocollo di Pulsed-Field Gel Electroforesis (PFGE).

2.2 Materiali e metodi

Campionamento

Il campionamento, iniziato ad Aprile 2005 e concluso a Dicembre 2006, è stato eseguito presso diversi macelli avicoli localizzati in Emilia-Romagna, Veneto ed Umbria. In queste strutture erano macellati sia polli (*Gallus gallus*) che tacchini (*Meleagris gallopavo*) provenienti da allevamenti di differente tipologia: convenzionale, estensivo e biologico.

Il pacchetto intestinale di ciascun animale è stato prelevato subito dopo l'eviscerazione e riposto in un sacchetto di nailon. Questa operazione era eseguita utilizzando guanti monouso sterili per evitare cross-contaminazioni. Il campione era mantenuto a temperatura di refrigerazione e consegnato entro 4 ore al nostro laboratorio, dove era processato.

Da ogni gruppo di animali veniva raccolto il pacchetto intestinale di 5 soggetti, fatta eccezione per le galline ovaiole per le quali ne sono stati raccolti solo 4.

In totale sono stati campionati 365 animali: 274 broiler, 36 galline ovaiole e 55 tacchini provenienti rispettivamente da 56, 9 e 11 diversi allevamenti. Dei 56 allevamenti di broiler campionati, 40 erano di tipologia convenzionale, 8 estensivi ed 8 biologici (vedi tabella 2 a pagina 73).

È stato inoltre campionato il contenuto ciecale di uno struzzo (*Struthio camelus*), pervenuto morto presso il nostro Dipartimento per accertamenti anatomopatologici.

Isolamento di *H. pullorum* da contenuto ciecale

H. pullorum è stato isolato applicando il protocollo “Isolamento di *H. pullorum* mediante l’impiego di membrana filtrante” descritto nel Capitolo 1 al punto 1.5.

Le piastre di primo isolamento sono state incubate fino ad un massimo di sette giorni e sottoposte giornalmente a lettura.

Al fine di valutare il grado d’infezione da *H. pullorum* in tutti i campioni analizzati, era registrato il numero di colonie riferibili a *H. pullorum* presenti sui terreni di primo isolamento.

Identificazione di *H. pullorum*

Per ogni campione risultato positivo, dalle piastre di primo isolamento sono state clonate un massimo di sei colonie riconducibili a *H. pullorum*. Questi isolati erano sottoposti ad una identificazione presuntiva (specificata sia per *H. pullorum* che per *H. canadensis*) utilizzando il protocollo di PCR descritto da Stanley *et al.* (1994) (figura 1a).

I primer impiegati in questa PCR, in grado di amplificare una porzione di 500 bp del 16S rRNA sia di *H. pullorum* che di *H. canadensis* erano: PullFW 5’-ATGAATGCTAGTTGTTGTCAG-3’ e PullRW 5’-GATTGGCTCCACTTCACA-3’.

Al fine di distinguere *H. pullorum* da *H. canadensis*, gli isolati risultati positivi alla PCR, sono stati sottoposti successivamente alla PCR - Restriction Enzyme Analysis (PCR-REA) descritta da Fox *et al.* (2000).

Questo protocollo prevedeva una prima fase di amplificazione di un prodotto di circa 1200 bp del 16S rRNA mediante l'impiego dei primer C97 - 5' GCTATGACGGGTATCC 3' e C05 - 5' ACTTCACCCCAGTCGCTG 3', il quale veniva successivamente sottoposto ad una fase di restrizione enzimatica mediante *ApaLI* (Fermentas).

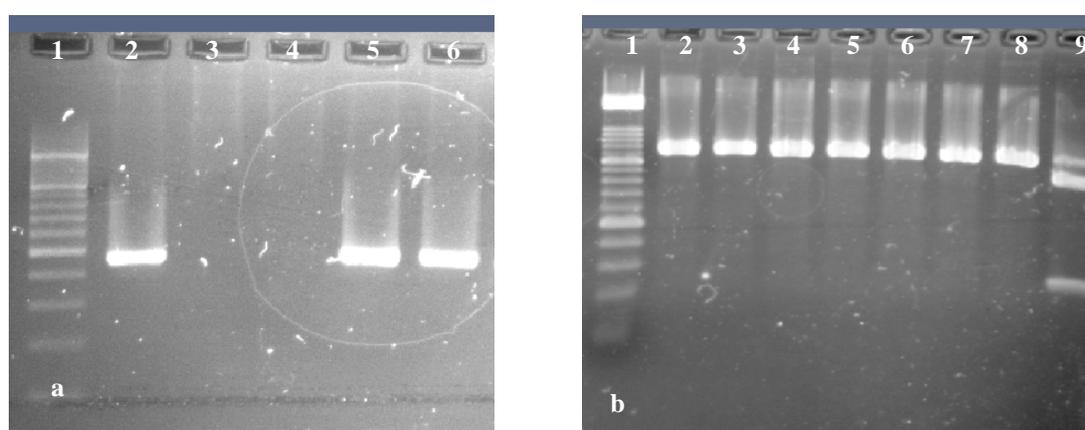


Figura 1.

a) PCR specifica per *H. pullorum* e *H. canadensis* (Stanley *et al.* 1994); Lane 1: Marker 100bp Ladder (Fermentas); Lane 2: *H. pullorum* isolato in questo studio; Lane 3: controllo negativo, *C. jejuni* CIP 70.2^T; Lane 4: acqua; Lane 5: *H. pullorum* CIP 104787^T; Lane 6: *H. canadensis* CCUG 47163^T.

b) PCR-REA impiegata per distinguere *H. pullorum* da *H. canadensis* (Fox *et al.* 2000); Lane 1: Marker 100bp Ladder (Roche); Lane da 2 a 7: 6 ceppi di *H. pullorum* isolati in questo studio; Lane 8: *H. pullorum* CIP 104787^T; Lane 9: *H. canadensis* CCUG 47163^T

Il prodotto ottenuto dopo restrizione era sottoposto ad elettroforesi in gel di agarosio al 1% per 30 minuti a 6 V/cm.

L'amplificato di *H. canadensis* era tagliato in due frammenti, uno di circa 950 bp e l'altro di 250 bp, mentre il prodotto di PCR di *H. pullorum* rimaneva integro (figura 1b).

L'estrazione del DNA totale dei batteri e l'esecuzione delle due PCR sono state effettuate utilizzando il Kit REExtract-N-Amp Tissue PCR (Sigma).

Studio del profilo proteico 1D-SDS PAGE degli isolati

L'analisi è stata eseguita su 74 isolati di *H. pullorum*, uno scelto a random per ogni allevamento risultato positivo. Il protocollo di analisi è stato messo a punto seguendo le indicazioni di Costas (1992) e Pot *et al.* (1994).

Partendo da una coltura di 48 ore su Brucella Agar (BD) addizionato del 5% di sangue ovino, è stata eseguita una sospensione in PBS del ceppo in esame con un'opacità pari a 1,5 OD₆₀₀. Un millilitro della sospensione era sottoposto a tre fasi di lavaggio in PBS mediante centrifugazione a 14000 g per 10 minuti a 4°C.

Dopo le fasi di lavaggio, il pellet è stato risospeso in 200 µl di buffer di estrazione costituito da 130 µl di PBS, 50 µl di NuPAGE LDS Sample Buffer (Invitrogen) e 20 µl di NuPAGE Sample Reducing Agent (Invitrogen).

La sospensione era sottoposta a trattamento termico a 95°C per 10 minuti e l'estratto proteico così ottenuto era conservato in congelatore a -80°C ed utilizzato per l'analisi entro 2 mesi dall'estrazione.

La corsa elettroferetica è stata eseguita caricando 5 µl del campione in esame in NuPAGE Novex 4-12% BIS TRIS Gelformat 1.0 mm 10 Well (Invitrogen) impiegando la cella per elettroferesi verticale Xcell SureLock™ Mini-Cell (Invitrogen). Le condizioni di corsa prevedevano corrente costante di 30 mA per 140 minuti in condizioni costanti di temperatura (5 ±3°C).

Il gel era quindi colorato mantenendolo immerso per un'ora in Simply Blue Safestain (Invitrogen) e in seguito decolorato mantenendolo, in agitazione, immerso in acqua deionizzata per 16 ore.

Terminata la fase di decolorazione, l'immagine digitale del gel era acquisita mediante FLUOR-S *MultiImager* (Bio-Rad) e il profilo proteico era analizzato mediante il software *Diversity Database* v 2.2 (Bio-Rad).

L'analisi computazionale prevedeva un processo di normalizzazione utilizzando come riferimento il *Mark 12 Wide Range Protein Standard* (Invitrogen). Il background relativo ad ogni *lane* è stato rimosso utilizzando come valore di riferimento "rolling disk 20".

La similarità tra i profili proteici è stata calcolata mediante il coefficiente di correlazione prodotto-momento di Pearson escludendo la regione variabile compresa tra le bande di 55,4 e 36 kDa, così come suggerito da Vandamme *et al.* (1991).

La clusterizzazione è stata eseguita mediante l'impiego dell'algoritmo *Unweighted Pair Group using Average linkage* (UPGMA) e il valore di similarità è stato espresso in percentuale.

Il livello di clusterizzazione degli isolati di *H. pullorum* in esame era valutato con riferimento alle diverse specie di *Helicobacter* presenti nel nostro database.

La riproducibilità della tecnica è stata valutata comparando la similarità intergel degli estratti proteici di *H. pullorum* CIP104787^T e di *H. canadensis* CCUC47163^T (inseriti in tutte le singole corse elettroforetiche) ponendo come valore di accettabilità il 90% tra profili dello stesso isolato. Tutti i gel erano analizzati anche visivamente comparando i profili dei diversi isolati con quelli dei ceppi di referenza utilizzati (Vandamme *et al.*, 1991).

Caratterizzazione biochimica degli isolati

La caratterizzazione biochimica è stata eseguita su 27 ceppi di *H. pullorum* isolati da 27 diversi allevamenti: 15 isolati da pollo, 11 da tacchino e 1 da struzzo.

La caratterizzazione biochimica ha previsto prove enzimatiche, prove di crescita e prove di sensibilità alla cefalotina e all'acido nalidixico.

Nella tabella 1 sono elencate tutte le prove eseguite ed i relativi ceppi di referenza impiegati quali controlli positivi e negativi.

Modalità di esecuzione delle prove enzimatiche

Test dell'**ossidasi**: sulla superficie di dischetti di nitrocellulosa (\varnothing 6mm) imbibiti con 50 μ l di una soluzione all'1% in acqua deionizzata di N,N,N,N-tetrametil-p-fenilendiamina dicloridrato (Sigma) veniva depositata abbondante patina batterica dell'isolato da testare, proveniente da una coltura di 48 h; la comparsa di una colorazione viola intenso entro 20 secondi era indice di positività (On e Holmes, 1992).

Test della **catalasi**: in una provetta contenente una soluzione fresca al 3% di perossido d'idrogeno era inserita un'ansata di patina batterica raccolta da un terreno di coltura privo di sangue (Nutrient Broth N°2 agarizzato addizionato del 10% di siero di cavallo); la comparsa di bolle entro 20-30 secondi era indice di reazione positiva (On e Holmes, 1992).

Test **dell'idrolisi dell'indoxyl acetato**: su dischetti di nitrocellulosa (\varnothing 6mm) imbibiti con 25 μ l di una soluzione al 10% (w/v) di indoxyl acetato (Sigma) in acetone veniva depositata abbondante patina batterica dell'isolato da testare, proveniente da una

coltura di 48 h; la comparsa entro 10-15 minuti di una colorazione blu intenso seconda era indice di positività (Mills e Gherna, 1987; On e Holmes, 1992).

Tabella 1. Elenco delle prove biochimiche e relativi ceppi di controllo impiegati per la caratterizzazione fenotipica degli isolati di *H. pullorum*

PROVE FENOTIPICHE*	CONTROLLO POSITIVO	CONTROLLO NEGATIVO
<i>Prove enzimatiche</i>		
Ossidasi	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922
Catalasi	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212
Ureasi	<i>Helicobacter hepaticus</i> CCUG 33637 ^T	<i>Helicobacter pullorum</i> CIP 104787 ^T
Idrolisi dell'ippurato	<i>Campylobacter jejuni</i> CIP70.2 ^T	<i>Helicobacter pullorum</i> CIP 104787 ^T
γ-Glutamiltrasferasi	<i>Helicobacter canis</i> ATCC 51401 ^T	<i>Helicobacter pullorum</i> CIP 104787 ^T
Fosfatasi alcalina	<i>Helicobacter canis</i> ATCC 51401 ^T	<i>Helicobacter pullorum</i> CIP 104787 ^T
Idrolisi dell'indoxil acetato	<i>Helicobacter canadensis</i> CCUG 47163 ^T	<i>Helicobacter pullorum</i> CIP 104787 ^T
Produzione di H ₂ S in TSI	<i>Campylobacter coli</i> ATCC 33559 ^T	<i>C. fetus</i> subsp. <i>venerealis</i> ATCC 19438 ^T
Riduzione dei Nitrati	<i>Helicobacter pullorum</i> CIP 104787 ^T	<i>Helicobacter canis</i> ATCC 51401 ^T
<i>Prove di crescita</i>		
MacConkey	<i>Campylobacter jejuni</i> ATCC 33560 ^T	<i>Helicobacter pullorum</i> CIP 104787 ^T
1% (w/v) glicina	<i>Campylobacter lari</i> LMG 8846 ^T	<i>Helicobacter pullorum</i> CIP 104787 ^T
1% (w/v) bile	<i>Helicobacter pullorum</i> CIP 104787 ^T	<i>Campylobacter concisus</i> LMG 6738 ^T
37°C (mO ₂ senza H ₂)	<i>Campylobacter jejuni</i> ATCC 33560 ^T	<i>Campylobacter concisus</i> LMG 6738 ^T
37°C (O ₂)	<i>Arcobacter butzleri</i> LMG 10828 ^T	<i>Campylobacter jejuni</i> ATCC 33560 ^T
37°C (AnO ₂)	<i>Arcobacter butzleri</i> LMG 10828 ^T	<i>Campylobacter jejuni</i> ATCC 33560 ^T
42°C (mO ₂)	<i>Campylobacter jejuni</i> ATCC 33560 ^T	<i>Arcobacter cryaerophilus</i> CCUG 17801 ^T
25°C (mO ₂)	<i>Arcobacter cryaerophilus</i> CCUG 17801 ^T	<i>Helicobacter pullorum</i> CIP 104787 ^T
<i>Prove di sensibilità</i>		
Acido nalidixico (30 µg)	<i>Campylobacter jejuni</i> ATCC 33560 ^T	<i>C. fetus</i> subsp. <i>venerealis</i> ATCC 19438 ^T
Cefalotina (30 µg)	<i>C. fetus</i> subsp. <i>venerealis</i> ATCC 19438 ^T	<i>Campylobacter jejuni</i> ATCC 33560 ^T

*mO₂ microaerofilia con H₂; O₂, atmosfera aerobica; AnO₂, anaerobiosi; TSI, triple sugar iron agar.

Test dell'idrolisi dell'ippurato di sodio: da una coltura fresca di 48 h dell'isolato in esame era allestita una sospensione batterica molto densa (lattescente) in 0,4 ml di una

soluzione acquosa all'1% di sodio ippurato (Sigma); la provetta era quindi incubata in bagnomaria a 35 ± 0.5 °C per 2 ore; dopo tale periodo venivano aggiunti 0,2 ml del reattivo ninidrina e si reincubava la provetta a 35 ± 0.5 °C per altri 15 minuti; la prova era considerata positiva quando si verificava lo sviluppo di colore blu-viola intenso (Harvey, 1980; On e Holmes, 1992).

Test della **produzione di idrogeno solforato in Triple Sugar Iron (TSI)**; l'isolato in esame veniva seminato su Triple Sugar Iron Agar (TSI, BD) ed incubato in microaerofilia 37 ± 1 °C per 5 giorni; la reazione era considerata positiva quando era evidenziabile una colorazione nera, anche in tracce, del terreno (On *et al.*, 1996).

Test dell'**ureasi**: l'attività dell'enzima è stata evidenziata sospendendo circa 10^8 batteri in 200 µl di urea di Christensen (BBL); dopo 6 ore di incubazione a 35 ± 1 °C lo sviluppo di una colorazione rossa era ritenuta indice di una reazione positiva (Owen *et al.*, 1985; On e Holmes, 1992).

Test della **fosfatasi alcalina (PAL)**: l'attività dell'enzima è stata evidenziata sospendendo circa 10^8 batteri in 200 µl di *Glicine buffer* (pH 9) contenente 0,2% di 4-Nitrofenil fosfato disodico (Fluka) e 1 mM di $MgCl_2$; dopo 1 ora di incubazione a 35 ± 1 °C lo sviluppo di una colorazione giallo intensa era ritenuta indice di una reazione positiva (Itoh *et al.*, 1987; On e Holmes, 1992).

Test della **γ -Glutamilttrasferasi (GGT)**; l'attività dell'enzima è stata evidenziata sospendendo circa 10^8 batteri in 100 µl d'acqua a cui è stato aggiunto 100 µl del reagente costituito da 100mM di TRIS (pH 8.25), 2.9 mM di L-Glutamic acid- γ -(*p*-nitroanilide) hydrochloride (Sigma) e 100mM di Glycyl-Glyline (Fluka); dopo 1 ora di

incubazione a $35\pm 1^{\circ}\text{C}$ lo sviluppo di una colorazione gialla era ritenuta indice di una reazione positiva (Chevalier *et al.*, 1999).

Test della **riduzione dei nitrati**: il terreno per l'esecuzione di questa prova è stato preparato aggiungendo a 100 ml di Nutrient Broth N°2 agarizzato 6 ml sangue ovino defibrinato e 0,5 ml di una soluzione al 20% di nitrato di potassio (Sigma); il test è stato eseguito seminando su una piastra (90 mm Ø) un solo ceppo batterico, depositando una quantità abbondante di patina batterica nel centro su una superficie di circa 2 cm; le piastre sono state incubate a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ per 48 ore; la presenza di una colorazione marrone scuro del terreno era indice di reazione positiva (Cook, 1950).

Modalità di esecuzione delle prove di crescita

I diversi terreni sono stati allestiti come indicato da On e Holmes (1991b) utilizzando come terreno base Nutrient Broth N°2 (Oxoid) agarizzato con 1,5% di Bacto-Agar (BD) e addizionato di 5% di sangue ovino (NA).

La titolazione dell'inoculo è stata eseguita allestendo una sospensione batterica dell'isolato in esame con opacità pari al valore 0,5 della scala di McFarland in Nutrient Broth N° 2 (Oxoid) partendo da colture di 48 h su NA. Tale sospensione era quindi diluita 1:100 in modo da ottenere una concentrazione finale di 10^6 UFC mL^{-1} .

Venti μl dell'inoculo di ogni isolato era seminato a spot su una piastra di:

- NA incubata a $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ in microaerofilia
- NA incubata a $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ in microaerofilia senza idrogeno
- NA incubata a $42 \pm 1^{\circ}\text{C}$ in microaerofilia
- NA incubata a $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ in aerobiosi

- NA incubata a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ in aerobiosi
- NA incubata a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ in anaerobiosi
- NA + 1% glicina incubata a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ in microaerofilia
- NA + 1% di bile incubata a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ in microaerofilia
- MacConkey Agar incubata a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ in microaerofilia

Su ogni piastra sono stati seminati non più di quattro ceppi avendo cura di ottenere uno spot che avesse un diametro di circa 1 cm (On e Holmes, 1991a).

La microaerofilia senza idrogeno è stata ottenuta utilizzando il sistema CampyGen (Oxoid).

L'anaerobiosi è stata ottenuta eseguendo un doppio lavaggio della giara con atmosfera modificata per anaerobiosi (10% H₂ 10% CO₂ 80% N₂) ed impiegando un catalizzatore al palladio.

Le letture di tutte le prove di crescita erano effettuate dopo 72 ore di incubazione.

Modalità di esecuzione della prova di sensibilità alla cefalotina e all'acido nalidixico

La sensibilità alla cefalotina e all'acido nalidixico è stata valutata mediante test di diffusione in Agar "Kirby-Bauer" utilizzando dischetti da 30 µg di ciascun antibiotico (BD). Le piastre erano incubate a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ in microaerofilia per 72 ore.

Il ceppo batterico in esame era considerato sensibile all'antibiotico se dopo incubazione era evidente attorno al dischetto un alone di inibizione (Ursing *et al.*, 1994).

Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) degli isolati

La tipizzazione mediante PFGE è stata eseguita su 34 ceppi di *H. pullorum* isolati da 14 allevamenti di broiler (2 ceppi per allevamento).

Il protocollo utilizzato è stato messo a punto sulla base delle indicazioni del "CAMPYNET-Prototype standardised protocol for Pulsed-Field Gel Electrophoresis-based DNA typing of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*" (The "Campynet" PFGE Subtyping Subgroup, 2000; <http://campynet.vetinst.dk/PFGE.html>).

Vengono di seguito riportate le diverse fasi del protocollo impiegato.

Inclusione dell'isolato in gel di agarosio a basso punto di fusione

- Sciogliere 0.3g di *Certified Megabase Agarose* (CMA, Bio-rad) in 20 ml di Tris/HCl –EDTA (TE) buffer ottenendo una concentrazione di agarosio pari al 1,5% (w/v) e lasciare raffreddare in bagnomaria a $55 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ per 30 minuti.
- Sospendere in 5ml di *Cell Suspension Buffer* (CSB, 100 mM Tris:100 mM EDTA, pH 8.0) la patina ceppo in esame proveniente da una coltura di 48 ore fino ad ottenere una densità ottica pari a 0.8-1 OD₆₀₀.
- Aliquotare 300µl della sospensione in una provetta tipo eppendorf da 1,5 ml.
- Aggiungere alla sospensione 18.8µl di una soluzione 20 mg/ml di Proteinasi K e miscelare pipettando 5-6 volte.
- Aggiungere 300µl di 1.5% CMA, miscelare pipettando 5-6 volte quindi distribuire immediatamente nel Plug Mold (Bio-rad) fino a riempimento dei pozzetti utilizzando una micropipetta, avendo l'avvertenza di non formare bolle.

- Lasciare solidificare le “plugs” prima a temperatura ambiente per 10 minuti e poi a 4°C per altri 10 minuti.
- Riporre le “plugs” in 5 ml di *Cell Lysis Buffer* (LB: 50 mM Tris:50 mM EDTA, pH 8.0, 1% di Sarcosyl, 1 mg/ml di Proteinasi K) quindi incubarle a 55± 0,5°C per 25 minuti.
- Eliminare LB ed effettuare due lavaggi di 20 minuti ciascuno con acqua ultrapura a 55± 0,5°C.
- Al termine del secondo lavaggio di acqua, effettuare 4 lavaggi di 20 minuti ciascuno con TE a 55± 0,5°C.
- Porre le “plugs” in 5ml di TE e conservare a 5 ± 3°C fino al momento dell’utilizzo per un periodo massimo di 6 mesi.

Digestione mediante enzima SacII;

- Tagliare la “plug” mediante un bisturi in modo da ottenere formando un parallelepipedo di circa 4x4 mm di base.
- Immergere la “plug” così tagliata in 196 µl del *Buffer* (1X) di reazione dell’enzima *SacII* in una provetta tipo eppendorff da 1,5 ml [il *Buffer* va diluito 1:10 utilizzando acqua ultrapura *DNasi e RNasi free* (Promega)].
- Aggiungere 4µl di *SacII* e miscelare pipettando 5-6 volte, avendo cura di non toccare la “plug”.
- Incubare overnight a 37±1°C.

Elettroforesi in campo pulsato (PFGE)

- Preparare il gel di corsa sciogliendo 1g di *Seakem Gold Agarose* (Lonza) in 100ml di Tris-Borate-EDTA buffer (TBE) 0.5x, per ottenere una concentrazione dell'1%.
- Raffreddare il gel a $55 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ per 30 minuti a bagnomaria.
- Allestire lo stampo per il gel avendo cura di pulire con alcool etilico assoluto la base dello stampo e verificare che lo stesso sia in bolla.
- Versare il gel 1% *Seakem Gold Agarose* nello stampo facendo attenzione a non formare bolle e lasciarlo solidificare per almeno 30 minuti.
- Mettere in bolla la cella elettroforetica.
- Versare il *buffer* di corsa TBE 0.5x (circa 2,5 L) nella cella e avviare il sistema di pompaggio e di raffreddamento impostando il *Cooling Module* (Bio-Rad) a 13°C .
- Aggiungere Prelevare 8ml di TE a 12 ml di CMA all'1,5% (CMA-TE).
- Sciogliere l'agar CMA-TE in microne e quindi raffreddarlo per 30 minuti in bagnomaria a $55 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$.
- Caricare nel primo, nel settimo e nel quindicesimo pozzetto *Lambda ladder standard* (Bio-rad).
- Caricare i ceppi di riferimento inserendo nel secondo pozzetto la "plug" di *Campylobacter jejuni* CIP 70.2^T e nel terzo quella di *Helicobacter pullorum* CIP 104787^T.
- Caricare le "plug" dei campioni in esame nei restanti pozzetti.
- Sigillare i pozzetti versando 3 ml di CMA-TE.

- Attendere 20 minuti affinché il CMA-TE solidifichi.
- Impostare il *Chef Mapper XA* (Bio-rad) con le seguenti condizioni di corsa: Two State; Gradiente: 5V/cm; Tempo: 22.5h; Angolo: 120°; Initial swich time: 0.5''; Final swich time: 40''; Rampinf factor: 0
- Inserire il gel nel supporto centrale e avviare la corsa.

Analisi dei profili elettroforetici

- Dopo la corsa elettroferetica, colorare il gel in un bagno di Bromuro di Etidio (1µg/ml) per 40 minuti.
- Decolorare il gel mantenendolo in agitazione immerso in acqua deionizzata per 1 ora.
- Acquisire l'immagine digitale del gel mediante FLUOR-S *MultiImager* (Bio-Rad).
- Analizzare i profili PFGE mediante il software *Diversity Database v 2.2* (Bio-Rad) applicando il coefficiente di Dice per calcolare i livelli di similarità ed UPGMA per eseguire la clusterizzazione.
- Utilizzare, per il confronto intergel, come *Bande set* il profilo di restrizione di *H. pullorum* CIP 104787^T impostando 4% come valore di tolleranza.
- Due profili di PFGE vengono considerati appartenenti allo stesso Pulsotipo quando manifestano un valore di similarità maggiore o uguale al 90% per le valutazioni intragel mentre maggiore o uguale all'80% per le valutazioni intergel.

2.3 Risultati

Isolamento

I dati relativi all'isolamento di *H. pullorum* dai campioni di contenuto ciecale di pollo, tacchino e struzzo vengono riportati nella tabella 2.

H. pullorum è stato isolato dal 83,6% degli animali campionati. Nello specifico *H. pullorum* è stato isolato dal 84,8% dei polli, dal 76,4% dei tacchini e dall'unico struzzo campionato.

La percentuale degli animali risultati positivi per *H. pullorum*, relativamente alla tipologia di allevamento variava dal 57,5% per i broiler estensivi ad un massimo del 100% per le galline ovaiole.

Tabella 2. Risultati relativi all'isolamento di *H. pullorum* da 366 animali provenienti da 77 differenti allevamenti. Il dato è scomposto per specie animale e per tipologia di allevamento.

Specie animale	Tipologia di allevamento	Numero animali			Numero allevamenti		
		campionati	positivi	(%)	Campionati	positivi	(%)
Pollo	Broiler convenzionali	194	166	(88,5)	40	40	(100)
	Broiler estensivi	40	23	(57,5)	8	5	(62,5)
	Broiler biologici	40	38	(95,0)	8	8	(100)
	Galline ovaiole	36	36	(100)	9	9	(100)
	Totale	310	263	(84,8)	65	62	(95,4)
Tacchino	Convenzionale	55	42	(76,4)	11	11	(100)
Struzzo	Convenzionale	1	1	(100)	1	1	(100)
	Totale	366	306	(83,6)	77	74	(96,1)

In 74 allevamenti su 77 campionati (96,1%) è stato possibile isolare *H. pullorum* da almeno un animale. Tre allevamenti estensivi di broiler sono risultati negativi. In 51 allevamenti (66,2%) è stato possibile isolare *H. pullorum* da tutti gli animali campionati.

Il numero di colonie riferibili a *H. pullorum* in tutte le piastre di primo isolamento è sempre risultato maggiore di 50 (figura 2).

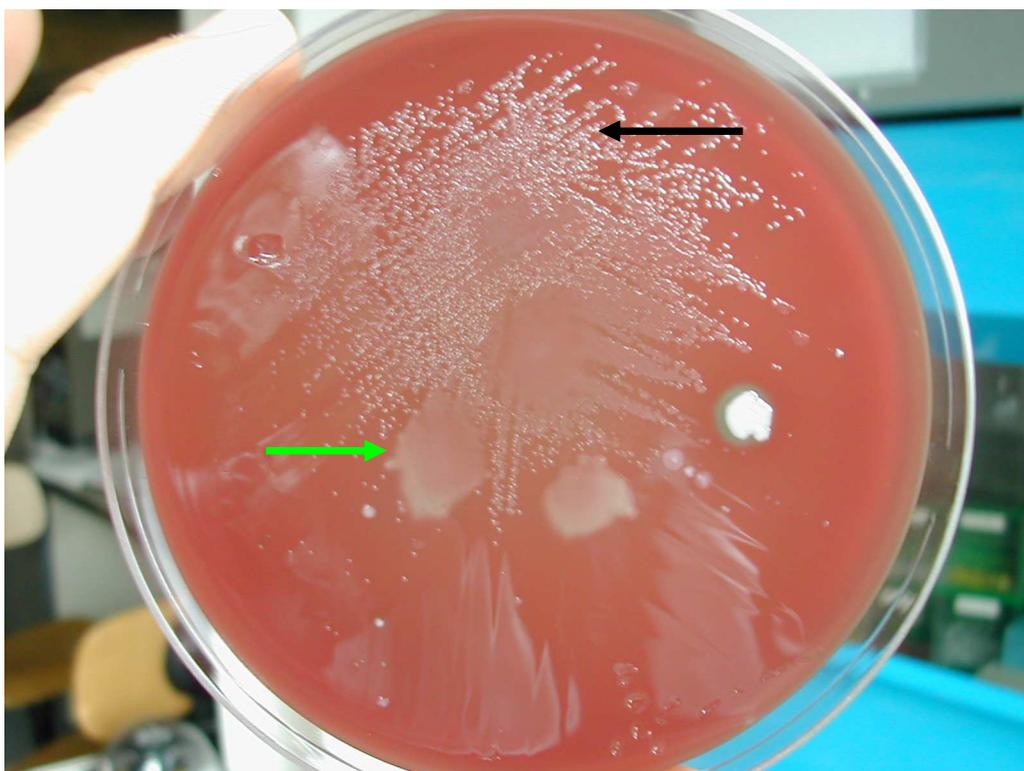


Figura 2. Piastra di primo isolamento dopo 5 giorni di incubazione (BR + 5% sangue ovino). Freccia nera, colonie puntiformi riferibili a *H. pullorum*. Freccia verde, colonie sciamanti di *Campylobacter* spp.

Considerando che la tecnica da noi impiegata comporta una riduzione di circa un *log* del numero dei batteri originariamente presenti nel campione, calcolando il volume di feci inoculato su una singola piastra, possiamo supporre che il livello di contaminazione da *H. pullorum* in tutti gli animali positivi risultasse sempre maggiore a $1,5 \times 10^4$ UFC g feci⁻¹.

Studio del profilo proteico in 1D-SDS PAGE

L'analisi computazionale dei 74 profili proteici degli isolati di *H. pullorum* esaminati ha rilevato un unico cluster, ad un livello di similarità del 88%, composto dai profili proteici degli isolati di campo e dai profili dei ceppi di riferimento *H. pullorum* CIP 104787^T e *H. canadensis* CCUG 47163^T. L'elevato livello di similarità tra i profili proteici di *H. pullorum* CIP 104787^T e *H. canadensis* CCUG 47163^T non ha permesso, all'analisi computazionale, la discriminazione tra queste due specie.

Diversamente, la comparazione dei profili proteici degli isolati di *H. pullorum* con quelli dei ceppi di riferimento [*H. canis* ATCC 51401^T, *H. cinaedi* CIP 103752^T, *H. fennelliae* CIP 103758^T, *H. bilis* ATCC 51630^T, *H. trogontum* ATCC 700117^T, "*H. rappini*" ATCC 49308, *H. acynonichis* ATCC 51101^T, *H. pullorum* CIP 104787^T e *H. canadensis* CCUG 47163^T], ha permesso di discriminare facilmente il cluster *H. pullorum/H. canadensis* dalle altre specie di *Helicobacter*.

H. cinaedi CIP 103752^T è risultata essere la specie più vicina al cluster *H. pullorum/H. canadensis*, con un livello di similarità del 81%.

Nella figura 3 (pag 76) sono illustrate tre differenti corse elettroforetiche in 1D-SDS PAGE dei profili proteici di 21 isolati di *H. pullorum* e dei ceppi di referenza *H. pullorum* CIP 104787^T e *H. canadensis* CCUG 47163^T.

Diversamente da quanto osservato all'analisi computazionale, i profili proteici di tutti i 74 isolati di campo di *H. pullorum* testati erano indistinguibili dal profilo di *H. pullorum* CIP 104787^T, mentre si differenziavano da quello di *H. canadensis* CCUG 47163^T per la presenza di un diverso profilo di bande tra 66,3 e 55,4 kDa e tra 31 e 14,4 kDa (figura 3).

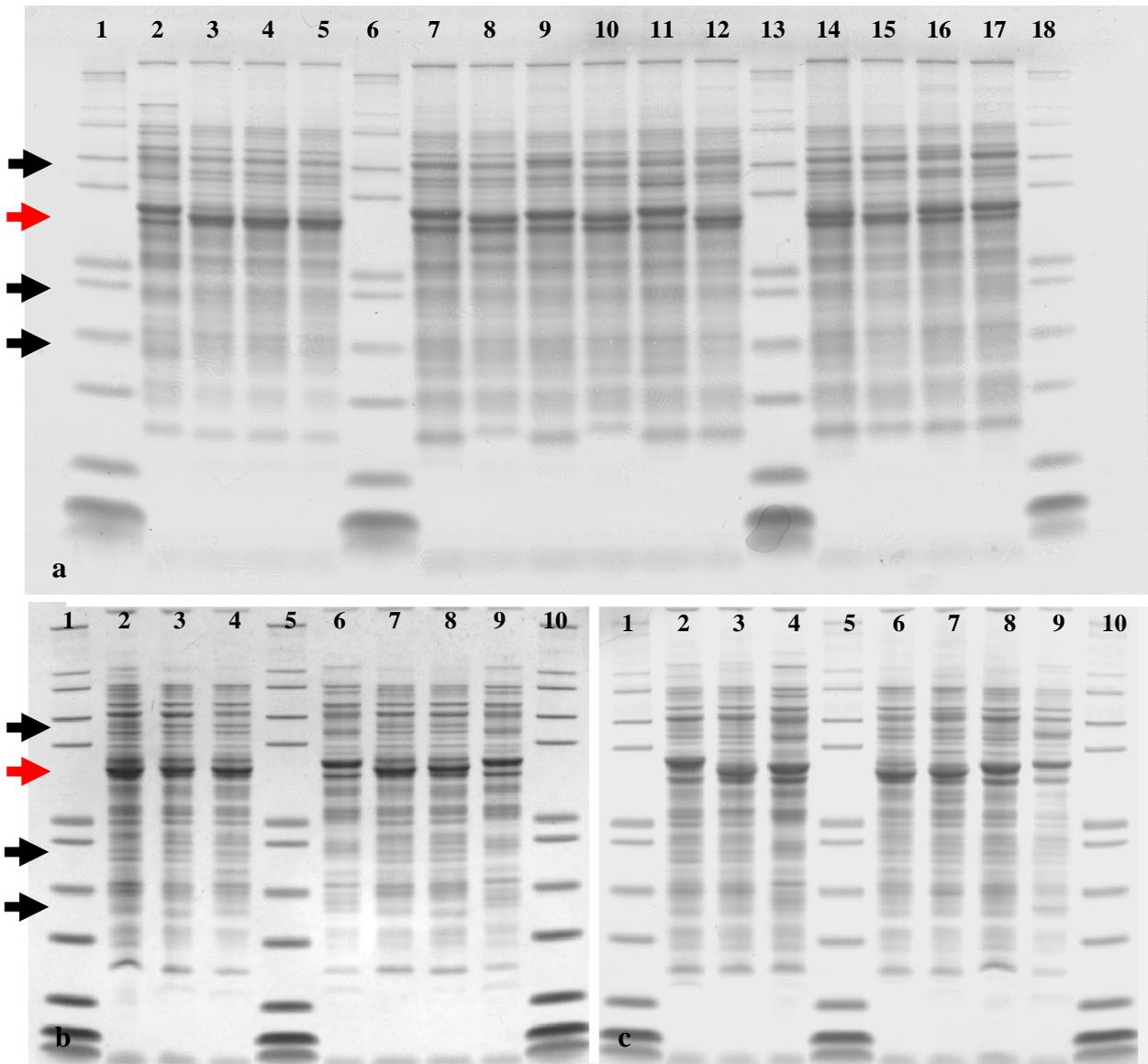


Figura 3. Profili proteici in 1D SDS-PAGE di 21 isolati di campo di *H. pullorum*.

Gel a) Lane 1, 6, 13 e 18: *Mark 12 Wide Range Protein Standard* (Invitrogen); Lane 2: *H. canadensis* CCUG 47163^T; Lane 3: *H. pullorum* CIP 104787^T; Lane 5: *H. pullorum* isolato da struzzo in questo studio; lane da 7 a 12 e da 14 a 17: *H. pullorum* isolati da tacchino;

Gel b) Lane 1, 5, e 10: *Mark 12 Wide Range Protein Standard* (Invitrogen); Lane 4: *H. pullorum* CIP 104787^T; Lane 6 e 9: *H. canadensis* CCUG 47163^T; Lane 2, 3, 7 e 8: *H. pullorum* isolati da pollo;

Gel c) Lane 1, 5, e 10: *Mark 12 Wide Range Protein Standard* (Invitrogen); Lane 4: *H. canadensis* CCUG 47163^T; Lane 6: *H. pullorum* CIP 104787^T; Lane 2, 3, 7, 8 e 9: *H. pullorum* isolati da pollo.

Le frecce nere indicano le regioni identiche tra i ceppi di *H. pullorum* e diverse da *H. canadensis*. La freccia rossa indica la regione ipervariabile compresa tra 39 kDa e 50 kDa esclusa dall'analisi.

Caratterizzazione biochimica

I risultati della caratterizzazione biochimica dei 27 ceppi di *H. pullorum* sono riportati nella tabella 3 (pag 78) e comparati con i risultati ottenuti da On *et al.* (1996) su 11 ceppi di *H. pullorum* isolati da pollo e da uomo e da Atabay *et al.* (1998) su 18 ceppi isolati da pollo.

Tutti i 27 isolati sono risultati positivi al test dell'ossidasi, della riduzione dei nitrati, ai test di crescita a 42°C, in anaerobiosi e in presenza dell'1% di bile e resistenti alla cefalotina. Tutti gli isolati sono risultati negativi al test dell'ureasi, della γ -glutamyltranspeptidasi, non hanno idrolizzato l'ippurato e l'indoxyl acetato, non sono cresciuti a 25°C, in condizioni di aerobiosi, in presenza di 1% di glicina e su MacConkey Agar. Le altre prove hanno mostrato un esito variabile: su un totale di 27 isolati 22 (81%) sono risultati positivi alla catalasi, 8 (22%) alla fosfatasi alcalina, 17 (63%) hanno prodotto H₂S in TSI, 18 (67%) sono cresciuti in condizioni di microaerofilia non arricchita con idrogeno e 5 (18%) sono risultati resistenti all'acido nalidixico.

Tabella 3. Risultati della caratterizzazione biochimica di 27 ceppi di *H. pullorum* isolati da pollo, tacchino e struzzo in questo studio comparati con quelli ottenuti da Atabay *et al.* (1998) e On *et al.* (1996)

	Percentuale dei ceppi positivi		
	In questo studio (n=27)	Atabay <i>et al.</i> (1998) (n=18)	On <i>et al.</i> (1996) ^a (n=10)
<i>Prove fenotipiche</i>			
<i>Prove enzimatiche</i>			
Ossidasi	100	100	99
Catalasi	81	89	88
Ureasi	0	0	1
Idrolisi dell'ippurato	0	0	1
γ -Glutamyltransferasi	0	0 ^b	ND
Fosfatasi alcalina	22	11	1
Idrolisi dell'indoxil acetato	0	0	1
Produzione di H ₂ S in TSI	63	100	50
Riduzione dei Nitrati	100	83	99
<i>Prove di crescita</i>			
MacConkey	0	0	1
1% (w/v) glicina	0	0	1
1% (w/v) bile	100	72	88
37°C (mO ₂)	100	100	99
37°C (mO ₂ senza H ₂)	67	0	ND
37°C (O ₂)	0	0	1
37°C (AnO ₂)	100	94	99
42°C (mO ₂)	100	78	99
25°C (mO ₂)	0	0	1
<i>Prove di sensibilità</i>			
Acido nalidixico (30 μ g)	18 ^d	28 ^c	6 ^c
Cefalotina (30 μ g)	100 ^d	89 ^c	99 ^c

^aI valori di percentuali pari a 0 e 100 sono stati aggiustati a 1 e 99 rispettivamente per permettere la comparazione numerica (vedi On *et al.*, 1996 per dettagli);

^bDati ottenuti mediante sistema API CAMPY (BioMérieux);

^cDati ottenuti come descritti da On e Holmes, 1991a;

^dDati ottenuti come descritto da Ursing *et al.*, 1994;

ND, dati non disponibili; mO₂ microaerofilia con H₂; O₂, atmosfera aerobica; AnO₂, anaerobiosi; TSI, triple sugar iron agar.

Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) di *H. pullorum*

I risultati relativi alla genotipizzazione dei 34 ceppi di *H. pullorum* isolati da 17 diversi allevamenti sono riportati nella tabella 4. Nella figura 4 è riportato il dendrogramma determinato mediante il coefficiente di Dice. In totale sono stati tipizzati 32 ceppi di *H. pullorum* su 34 testati, i quali hanno dato origine a 19 differenti Pulsotipi.

Tabella 4. Elenco dei Pulsotipi ottenuti dall'analisi di 34 ceppi di *H. pullorum* isolati da 17 differenti allevamenti di broiler e del ceppo tipo *H. pullorum* CIP 104787^T.

Pulsotipo	Ceppi di <i>H. pullorum</i>*
A	226/05B, 226/05C, 228/05B
B	220/05A
C	249/05E, 249/05C
D	246/05C, 246/05B
E	220/05D
F	244/05B
G	244/05A
H	235/05D, 235/05E, 237/05A, 237/05B
I	221/05D, 221/05C
J	223/05C, 223/05B
K	229/05D, 229/05C
L	232/05E
M	230/05B
N	230/05D
O	238/05D, 238/05A
P	240/05D, 240/05C
Q	232/05D
R	224/05A 224/05D, 225/05D
S	<i>H. pullorum</i> CIP 104787 ^T
non tipizzati	228/05A, 225/05A

*il numero identifica l'allevamento, la lettera l'animale

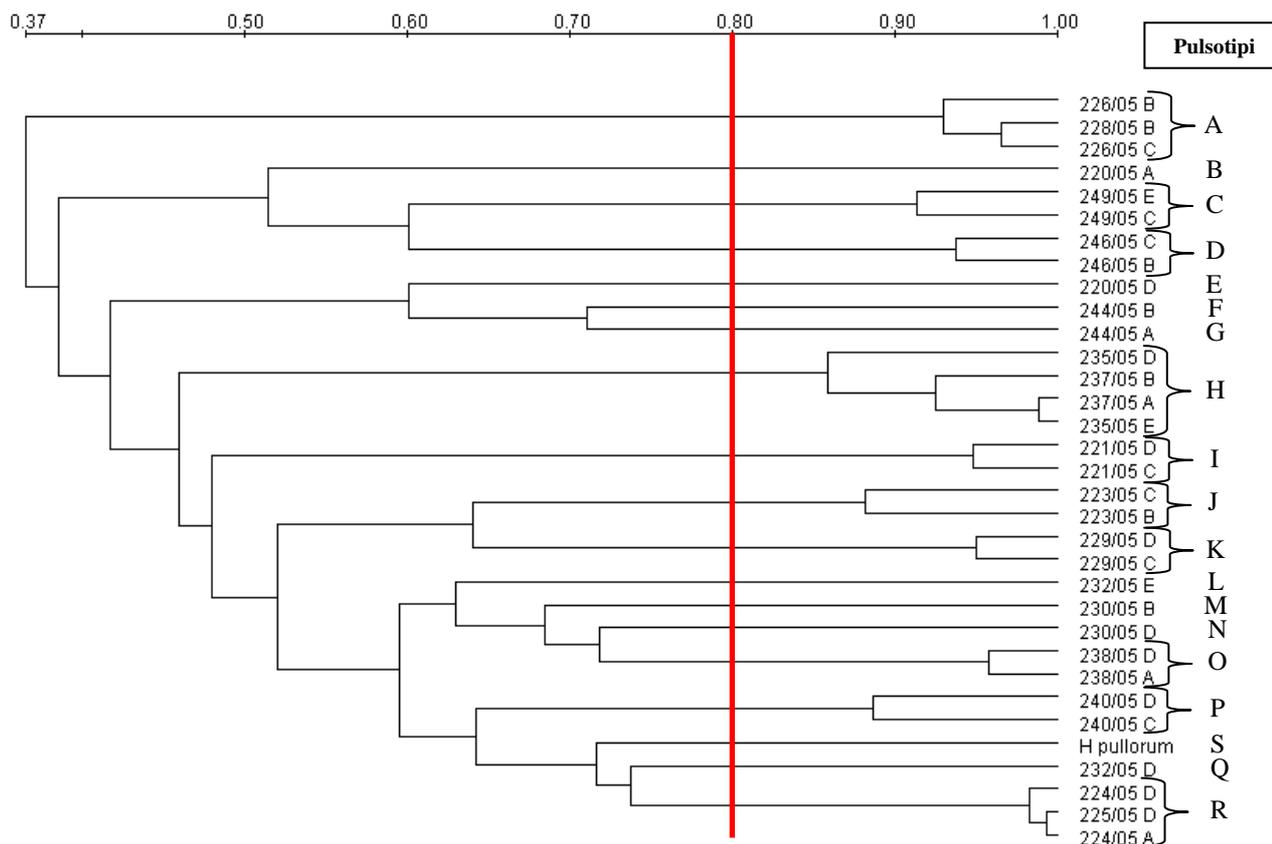


Figura 4. Dendrogramma con radice risultante dall'analisi dei 34 profili dei ceppi di *H. pullorum* isolati da 17 differenti allevamenti di pollo e del ceppo tipo *H. pullorum* CIP 104787^T. I numeri sulla barra orizzontale indicano il valore di similarità determinato mediante il coefficiente di Dice. L'albero è stato costruito applicando l'algoritmo di clusterizzazione UPGMA. La barra verticale rossa indica il valore di similarità utilizzato per differenziare i diversi Pulsotipi identificati nella colonna a lato della figura.

Per due ceppi (228/05A, 225/05A) appartenenti a due diversi allevamenti, non è stato possibile ottenere un profilo di restrizione a causa di fenomeni di degradazione del DNA (figura 5).

Tre pulsotipi (A, H, R) raggruppano profili di ceppi appartenenti a due allevamenti, 7 (C, D, I, J, K, O, P, R) i profili di ceppi appartenenti allo stesso allevamento mentre 8 profili (B, E, F, G, L, M, N, Q, S) sono rappresentati da un singolo ceppo.

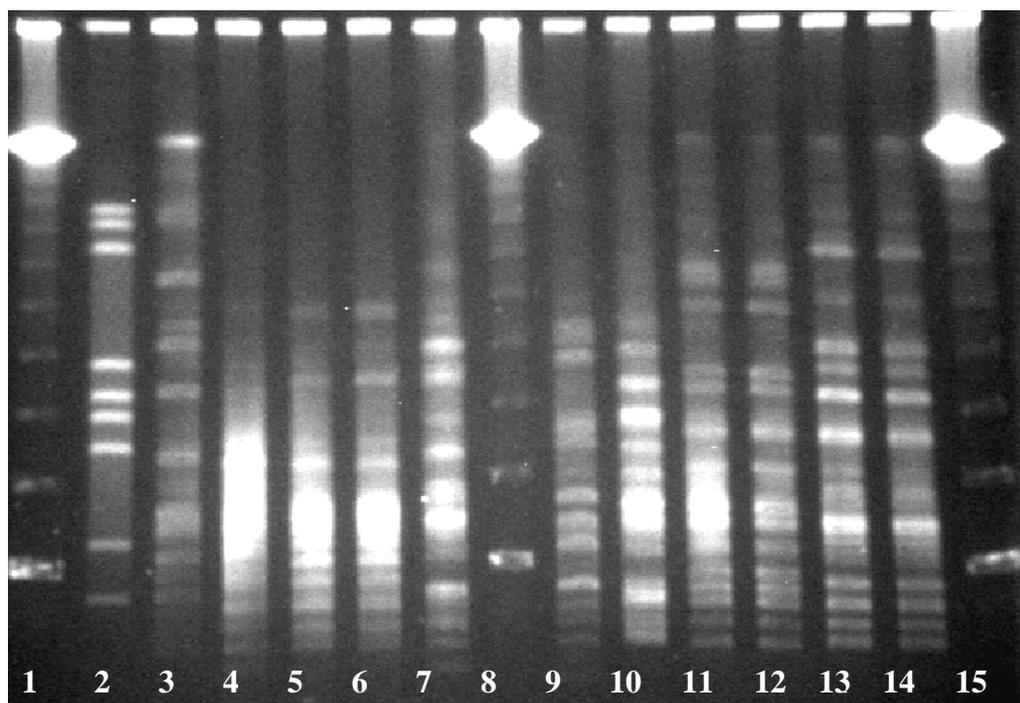


Figura 5. PFGE di ceppi di *H. pullorum* ottenuti mediante digestione con *SacII*. È possibile notare nella Lane 4 l'assenza di un profilo di restrizione a seguito di fenomeni legati alla degradazione del DNA. Lane 1, 8 e 15: DNA marker, Lambda Ladder (Bio-rad); Lane 2: *C. jejuni* CIP 70.2^T; Lane 3: *H. pullorum* CIP 104787^T; Lane 4: *H. pullorum* 225/05A; Lane 5: *H. pullorum* 235/05E; Lane 6: *H. pullorum* 237/05A; Lane 7: *H. pullorum* 240/05D; Lane 9: *H. pullorum* 244/05A; Lane 10: *H. pullorum* 244/05B; Lane 11: *H. pullorum* 246/05B; Lane 12: *H. pullorum* 246/05C; Lane 13: *H. pullorum* 249/05C; Lane 14: *H. pullorum* 249/05E.

2.4 Discussione

I risultati ottenuti relativamente a questa fase dell'indagine, hanno permesso di mostrare un'elevata prevalenza di *H. pullorum* in Italia nelle specie avicole da noi campionate, individuando almeno un animale positivo nel 96,4% degli allevamenti.

H. pullorum è stato isolato nel pollo da molti autori (Stanley *et al.*, 1994; Burnens *et al.*, 1996; Atabay *et al.*, 1998; Ceelen *et al.*, 2006c) ed è inoltre stato segnalato in altre specie di volatili quali pernice (Nebbia *et al.*, 2007) e pappagallo (Ceelen *et al.*, 2006b), ma nessun dato risultava essere disponibile per altre specie avicole di interesse zootecnico quali il tacchino e lo struzzo. Questa indagine ha permesso per la prima volta

di isolare *H. pullorum* anche da queste due specie, dimostrandone un'ampia diffusione nelle specie aviarie allevate a scopo alimentare.

Gli elevati valori di prevalenza osservati sia nei polli (84,8%) che nei tacchini (76,4%), associati ad alti livelli di contaminazione del contenuto cecale ($>1,5 \times 10^3$ UFC·g⁻¹), indicano che *H. pullorum* colonizza normalmente la flora enterica di queste specie. Le specie avicole rappresentano, come osservato per alcuni *Campylobacter* termofili (Lee e Newell, 2006), i reservoir naturali di questo microorganismo.

Il protocollo d'isolamento da noi ottimizzato, basato sul metodo della membrana filtrante originariamente descritto da Steele e McDermott (1984), è risultato molto sensibile ed adatto per definire la prevalenza di *H. pullorum* nelle specie avicole permettendo di ottenere un numero molto elevato di isolati (306). In modo particolare, il differente tasso d'isolamento da noi rilevato (83,6%), rispetto a quello descritto da Ceelen *et al.* (2006c) (14%), è probabilmente da riferire all'utilizzo, nel nostro caso, di un filtro da 0,65 µm invece di quello da 0,45 µm, di microaerofilia con idrogeno anche durante la fase di filtraggio e di processazione di campioni freschi.

I dati di profilo proteico eseguito su un numero significativo di isolati ha permesso di validare, nell'ambito di un approccio polifasico, il protocollo d'identificazione genotipica proposto da Fox *et al.* (2000) ed impiegato in questa indagine per la valutazione della prevalenza di *H. pullorum*.

Sebbene l'applicazione dell'analisi computazione dei profili proteici non sia stata in grado di differenziare *H. pullorum* da *H. canadensis* questi due batteri, molto simili sia dal punto di vista fenotipico che genotipico, sono stati distinti facilmente mediante

l'analisi visuale confermando l'utilità di questo metodo nel classificare ed identificare le diverse specie del genere *Helicobacter* (Vandamme *et al.*, 1991).

Per quanto riguarda la caratterizzazione biochimica degli isolati, i risultati da noi ottenuti sono sovrapponibili a quelli presentati da On *et al.* (1995) e da Atabay *et al.* (1998), fatta eccezione per le prove di crescita in assenza d'idrogeno.

Atabay *et al.* (1998) osservarono che nessuno dei 18 ceppi di *H. pullorum* isolati da pollo da loro studiati era in grado di crescere in condizioni di microaerofilia non arricchita con idrogeno. Diversamente, in questo studio l'analisi di un cospicuo numero d'isolati ha permesso di evidenziare come alcuni ceppi possano crescere in queste condizioni. Questi dati indicano che *H. pullorum* non è strettamente dipendente dalla presenza di alte concentrazioni di idrogeno e che in alcuni casi è possibile isolarlo anche in condizioni normalmente impiegate per la ricerca di *C. jejuni* o *C. coli*, come già osservato da Steinbrueckner *et al.* (1997) su ceppi isolati dall'uomo.

L'utilizzo di un'atmosfera arricchita d'idrogeno rimane comunque fondamentale per poter definire la corretta prevalenza di *H. pullorum* sia negli animali che nell'uomo in quanto la maggior parte dei ceppi finora analizzati è in grado di crescere solo in queste condizioni.

La tipizzazione genotipica ha permesso di confermare in parte i dati presentati da Gibson *et al.* (1999) e da Ceelen *et al.* (2006c). Questa specie presenta un elevato livello di variabilità intraspecifica con scarso andamento clonale, anche se è stato possibile osservare, diversamente da quanto rilevato da altri autori, che alcuni cloni sono distribuiti su più allevamenti.

CAPITOLO 3

Indagine sulla presenza di *Helicobacter pullorum* da feci di pazienti umani affetti da patologia gastroenterica

3.1 Introduzione	87
3.2 Materiali e metodi	89
3.3 Risultati	90
3.4 Discussione	91

3.1 Introduzione

Le segnalazioni relative all'isolamento di *H. pullorum* dall'uomo risultano oggi giorno poco numerose e sempre associate a forme di patologia gastroenterica. Nella tabella 1 sono riportati i 21 casi segnalati in letteratura internazionale dal 1994 al 2005.

Tabella 1. Elenco dei 21 casi riportati in letteratura internazionale relativi all'associazione di *H. pullorum* con quadri di gastroenterite nell'uomo.

Numero casi	Stato clinico	Origine geografica	Referenza
1	Gastroenterite ed epatite	Svizzera	Burnens <i>et al.</i> , 1994
2	Gastroenterite-paziente positivo HIV	Svizzera	Burnens <i>et al.</i> , 1994
3	Gastroenterite-concomitante infezione con <i>Campylobacter jejuni</i>	Svizzera	Burnens <i>et al.</i> , 1994
4	Diarrea-paziente con immunodeficienza	Germania	Steinbrueckner <i>et al.</i> , 1997
5	Gastroenterite	Germania	Steinbrueckner <i>et al.</i> , 1997
6	Gastroenterite ^a	Canada	Melito <i>et al.</i> , 2000
7	Gastroenterite ^a	Canada	Melito <i>et al.</i> , 2000
8	Gastroenterite ^a	Canada	Melito <i>et al.</i> , 2000
9	Gastroenterite ^a	Canada	Melito <i>et al.</i> , 2000
10	Gastroenterite ^a	Canada	Melito <i>et al.</i> , 2000
11	Gastroenterite ^a	Canada	Melito <i>et al.</i> , 2000
12	Gastroenterite ^a	Canada	Melito <i>et al.</i> , 2000
13	Gastroenterite ^a	Canada	Melito <i>et al.</i> , 2000
14	Gastroenterite ^a	Canada	Melito <i>et al.</i> , 2000
15	Gastroenterite ^a	Canada	Melito <i>et al.</i> , 2000
16	Gastroenterite ^a	Canada	Melito <i>et al.</i> , 2000
17	Gastroenterite ^b	Olanda	Kuijper <i>et al.</i> , 2003
18	Gastroenterite ^b	Olanda	Kuijper <i>et al.</i> , 2003
19	Gastroenterite ^c	Francia	InVS, 2005 ^d
20	Gastroenterite ^c	Francia	InVS, 2005 ^d
21	Gastroenterite	Belgio	Ceelen <i>et al.</i> , 2005a

^a: isolamento avvenuto nel periodo 1993-1999

^b: isolamento avvenuto nel periodo 1995-2001

^c: isolamento avvenuto nel periodo 2004-2005

^d: dati disponibili in <http://www.invs.sante.fr/surveillance/index.htm>

L'unico studio eseguito per definire la prevalenza di *H. pullorum* nell'uomo sia su pazienti sani sia su soggetti con forme gastroenteriche, è stato condotto in Belgio nel 2005 (Ceelen *et al.*, 2005a). In questa indagine gli autori verificarono, mediante PCR (Stanley *et al.* 1994), una positività per *H. pullorum* pari a circa il 4% sia nei soggetti sani che in quelli affetti da gastroenterite, ma riuscirono ad isolare *H. pullorum* soltanto da un individuo malato. I dati presentati nello studio di Ceelen *et al.* (2005a), sulla base dei risultati ottenuti mediante una PCR non specifica per *H. pullorum*, metterebbero in discussione il ruolo eziologico di questa specie nelle forme di gastroenterite nell'uomo, anche se la mancanza di un numero sufficiente di ceppi umani non permette ancora di escluderlo totalmente. Infatti, secondo diversi autori il numero limitato di segnalazioni di *H. pullorum* nell'uomo è da ricondurre essenzialmente alle difficoltà legate all'isolamento ed alla corretta identificazione di questo microrganismo (Steinbrueckner *et al.*, 1997; Gibson *et al.*, 1999; Melito *et al.*, 2000).

Attualmente, la considerazione di questa specie quale patogeno emergente trasmissibile con gli alimenti si basa solo su alcune analogie riscontrate con *Campylobacter jejuni*, per il quale è ormai appurato il ruolo nella patologia gastroenterica nell'uomo associato al consumo di carne di pollame. Non esiste ad oggi un dato sperimentale che dimostri il passaggio di *H. pullorum* da animale, ed in modo particolare da pollo o altre specie avicole, all'uomo e viceversa. Rimane quindi aperta la questione del ruolo di questi animali come potenziali sorgenti d'infezione per l'uomo.

In questo capitolo sono riportate le attività di ricerca condotte al fine di isolare ceppi di *H. pullorum* dall'uomo da sottoporre in seguito a genotipizzazione per valutare le eventuali relazioni genetiche tra ceppi umani ed animali.

3.2 Materiali e Metodi

Campionamento

Da Settembre 2006 a Novembre 2007 sono stati raccolti presso il Laboratorio di Microbiologia dell'Ospedale Sant'Orsola-Malpighi di Bologna 151 campioni di feci da pazienti ospedalizzati affetti da patologia gastroenterica. I diversi campioni sono stati selezionati sulla base dei seguenti criteri: il paziente non doveva aver assunto antibiotici da almeno due mesi prima del prelievo; l'intervallo di tempo tra la raccolta del campione ed il suo congelamento non doveva superare le 2 ore.

Sono stati campionati 59 pazienti di età inferiore ai 15 anni, 52 di età compresa tra i 15 e i 60 anni e 40 di età superiore ai 60 anni.

Tutti i campioni sono stati raccolti e conservati in attesa di essere processati seguendo un medesimo protocollo. Circa un 1 g di feci, entro due ore dalla raccolta, era omogeneizzato in 1 mL di un diluente crioprotettore sterile così formulato: 250 µl di Bacto-Brain Heart Infusion (BD) 750 µl di siero equino inattivato e 0,75 g di glucosio (Sigma). Il campione era poi immediatamente congelato a -80°C per un periodo non superiore ai due mesi. Il trasporto dei campioni dall'ospedale al nostro laboratorio avveniva in azoto liquido al fine di mantenerlo ad una temperatura $\leq 80^{\circ}\text{C}$.

I campioni da noi processati erano parallelamente sottoposti dal personale del laboratorio ospedaliero alle indagini routinarie finalizzate alla ricerca di agenti batterici e virali possibili responsabili di gastroenterite nell'uomo.

Isolamento di batteri spirillari Gram negativi microaerofili

Dopo scongelamento rapido, tutti i campioni erano processati secondo il protocollo “Isolamento di *H. pullorum* mediante l’impiego di membrana filtrante” (punto 1.5 del Capitolo 1) e mediante semina diretta su terreno selettivo mCCDA (cefoperazone 32 µg mL⁻¹). Al fine di aumentare la sensibilità della tecnica ciascun campione era processato in doppio. A differenza di quanto effettuato per i campioni di pollo e tacchino, tutte le colonie riferibili a microrganismi Gram negativi spirillari microaerofili erano clonate e sottoposte ad identificazione.

Identificazione

Tutti gli isolati sono stati sottoposti a due protocolli di PCR specifici rispettivamente per il genere *Helicobacter* (Bohr *et al.* 2002) ed il genere *Campylobacter* (Linton *et al.* 1996). L’estrazione del DNA e l’esecuzione della PCR sono state eseguite utilizzando il Kit REDExtract-N-Amp Tissue PCR (Sigma).

3.3 Risultati

Tutti i 151 campioni analizzati sono risultati negativi all’isolamento di *Helicobacter* spp. Otto campioni sono risultati positivi all’isolamento di *Campylobacter* spp.; di questi, quattro presentavano un numero clinicamente significativo di colonie riconducibili a *C. jejuni*, mentre dagli altri 4 sono stati isolati *Campylobacter* non termofili in quantità molto esigua. L’identificazione di *C. jejuni* è stata eseguita mediante l’impiego di una Multiplex PCR (Linton *et al.*, 1996).

3.4 Discussione

In questa prima indagine, pur utilizzando un protocollo d'isolamento più sensibile rispetto a quella impiegato da Ceelen *et al.* (2005a) grazie all'impiego di membrane filtranti con porosità maggiore e di un terreno selettivo, non è stato possibile ottenere nessun isolato di *H. pullorum* da feci umane.

Sulla base degli studi presentati nel primo capitolo della presente tesi, la sensibilità della tecnica da noi impiegata permetteva di isolare *H. pullorum* quando presente a concentrazioni $\geq 10^3$ UFC/grammo. In futuro un protocollo di PCR Real-Time in grado di rilevare e quantificare la presenza di *H. pullorum* dalle feci umane, potrebbe essere impiegato per selezionare i campioni positivi con concentrazioni di *H. pullorum* tali da permetterne l'isolamento. Questo approccio permetterebbe di ottenere dati di prevalenza di *H. pullorum* nell'uomo e di aumentare notevolmente la possibilità di isolarlo grazie allo screening di un numero molto elevato di campioni.

Oltre ai pazienti affetti da gastroenterite sarà opportuno estendere il campionamento anche a soggetti a rischio d'infezione quali operatori del settore avicolo ed, in particolare, allevatori, veterinari e personale operante presso i macelli.

CAPITOLO 4

Antibiotico resistenza in *Helicobacter pullorum*

4.1 Introduzione	95
4.2 Materiali e metodi	98
4.3 Risultati	106
4.4 Discussione	113

4.1 Introduzione

Nell'ambito del grave problema dell'antibiotico-resistenza, la comunità scientifica sta discutendo da molti anni sull'impatto negativo in sanità pubblica derivante dall'impiego anche in medicina veterinaria di antibiotici registrati per l'uomo (Collignon 2005; US Food and Drug Administration, 2005: <http://www.fda.gov/oc/antimicrobial/baytril.pdf>).

Un esempio eclatante è rappresentato dai fluorochinoloni, i quali sono normalmente usati sia nella pratica medica sia in veterinaria. L'impiego di questi antibiotici in ambito veterinario risale al 1993 in Danimarca e al 1994 negli USA; questi antibiotici hanno trovato largo impiego in particolare nel settore avicolo. L'agenzia americana US Food and Drug Administration nel 2005 (<http://www.fda.gov/oc/antimicrobial/baytril.pdf>) ha denunciato che, negli USA, come conseguenza all'introduzione dei fluorochinoloni nella pratica veterinaria, la percentuale d'isolati umani di *Campylobacter jejuni* resistenti a questi antibiotici, sia passata in sette anni da una prevalenza del 1% ad un valore del 10% (Luber *et al.*, 2003). La registrazione di questo fenomeno ha portato le autorità sanitarie americane a vietare l'uso dei fluorochinoloni in ambito avicolo a partire da Settembre 2005.

Sebbene il ruolo zoonosico di *H. pullorum* non sia ancora stato chiarito, dal momento che la sua prevalenza negli allevamenti avicoli si è dimostrata particolarmente elevata, abbiamo ritenuto opportuno provvedere ad aumentare le conoscenze sull'andamento dell'antibiotico resistenza in questa specie. Gli unici dati relativi all'antibiotico-

resistenza di *H. pullorum* sono quelli descritti da Ceelen *et al.* (2005b). Questi autori hanno concentrato la loro indagine su ceppi provenienti solo da 3 allevamenti di broiler.

Tra i diversi antibiotici testati particolare interesse è stato rivolto ai fluorochinoloni per i quali, vista l'importanza in terapia umana, è stato deciso di definirne i meccanismi molecolari alla base della resistenza in *H. pullorum*.

I fluorochinoloni agiscono inibendo le DNA topoisomerasi di tipo II: DNA girasi e Topoisomerasi IV. Questi enzimi regolano la superspiralizzazione negativa del DNA batterico e attenuano le tensioni topologiche durante le fasi di trascrizione e replicazione batterica (Drlica e Zhao, 1997). Mutazioni puntiformi che sono in grado di modificare questi enzimi conferiscono resistenza. In modo particolare, sostituzioni aminoacidiche nella così detta "Quinolone Resistant Determining Region" (QRDR) delle subunità GyrA e GyrB di DNA girasi e ParC e ParE di Topoisomerasi IV rappresentano il principale meccanismo molecolare (Chen e Lo, 2002).

Il sequenziamento del genoma di *H. pylori* (Tomb *et al.*, 1997), *H. hepaticus* (Suerbaum *et al.*, 2003), *C. jejuni* (Miller *et al.*, 2007) e *Arcobacter butzleri* (Gundogdu *et al.*, 2007) ha rivelato l'assenza in questi batteri dei geni *parC* e *parE* di Topoisomerasi IV. Negli Epsilonproteobatteri l'unico sito bersaglio riconosciuto per i fluorochinoloni risulta essere quindi la DNA girasi.

L'evento centrale nell'interazione tra i chinoloni e la girasi è la formazione di un complesso tra il farmaco-enzima-DNA in grado di inibire la trascrizione e conseguentemente la replicazione batterica (Drlica e Zhao, 1997).

Nella DNA girasi, la regione QRDR è situata in corrispondenza del sito attivo (Tyr-122 in *Escherichia coli*) nella porzione N-terminale del gene *gyrA* (compresa tra

l'aminoacido 51 e 106 in *E. coli*) e codifica per la parte di proteina coinvolta nel legame con il DNA (Chen e Lo, 2002). Le principali mutazioni per sostituzione implicate nella resistenza ai fluorochinoloni avvengono in questa porzione di *gyrA* e solo raramente coinvolgono la subunità B codificata dal gene *gyrB*. Queste mutazioni compaiono in corrispondenza dei codoni 83 e 87 in *E. coli* (Chen e Lo, 2002), che corrispondono ai codoni 87 e 91 in *H. pylori*, 86 e 90 in *C. jejuni* e 85 e 89 in *A. butzleri*. Mutazioni per sostituzione in questi siti sono stati associati in tutti gli Epsilonproteobatteri ad un alto livello di resistenza verso i fluorochinoloni (Piddock *et al.*, 2003; Abdelbaqi *et al.*, 2007; Cattoir *et al.*, 2007).

Non essendo disponibile la sequenza del gene *gyrA* di *H. pullorum* per verificare se le resistenze verso i fluorochinoloni fossero legate a mutazioni della QRDR di questo gene anche in questa specie, è stato necessario provvedere prima di tutto all'isolamento del gene, quindi all'individuazione della QRDR e infine al confronto delle sequenze di questa porzione di *gyrA* in isolati risultati resistenti e sensibili.

4.2 Materiali e metodi

Ceppi batterici e modalità di estrazione del DNA.

La determinazione delle Concentrazioni Minime Inibenti (CMI) è stata eseguita per tutti i 74 isolati di *H. pullorum*, uno per ogni allevamento positivo (gli stessi isolati sottoposti allo studio del profilo proteico in 1D SDS PAGE). Inoltre sono stati impiegati i seguenti ceppi di riferimento: *H. pullorum* CIP104787^T, *Campylobacter jejuni* ATCC 33560, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Escherichia coli* ATCC 25922.

Sulla base dei diversi profili di resistenza alla ciprofloxacina e all'acido nalidixico, il ceppo tipo *H. pullorum* CIP 104787^T, 9 ceppi isolati da pollo e 9 isolati da tacchino sono stati selezionati per valutare i meccanismi molecolari legati alla resistenza ai fluorochinoloni. In tabella 3 sono elencati i ceppi selezionati ed i relativi profili di resistenza per ciprofloxacina ed acido nalidixico.

Il DNA cromosomiale dei batteri in esame è stato estratto utilizzando DNA tissue mini kit (Qiagen) seguendo le indicazioni della casa costruttrice.

Molecole antibiotiche testate

È stata saggiata l'attività *in vitro* dei seguenti agenti antibatterici: ampicillina, cloramfenicolo, tetraciclina, eritromicina, gentamicina, ciprofloxacina e acido nalidixico. Tutti gli antibiotici sono stati acquistati presso Sigma-Aldrich S.r.l. tranne ciprofloxacina acquistata presso Bayer S.p.a. Per ogni ceppo batterico sono state saggiate 14 concentrazioni di antibiotico il cui range variava da 128 a 0.015 µg·mL⁻¹.

Determinazione delle Concentrazioni Minime Inibenti (CMI)

La determinazione delle CMI dei ceppi di *H. pullorum* è stata eseguita mediante il metodo delle diluizioni in agar, riportato al punto 3.2.8 “*Campylobacter jejuni* and Related Species” nel documento del National Committee for Clinical Laboratory Standard (NCCLS), M31-A2 (NCCLS, 2002).

Il protocollo è stato modificato come indicato in nota. In breve, partendo da una coltura di 48 ore per ogni ceppo da analizzare è stata allestita una sospensione con torbidità equivalente al valore 0.5 della scala McFarland che era in seguito diluita 1:10 ($\sim 1-4 \cdot 10^7$ UFCmL⁻¹). L'inoculazione è stata eseguita seminando sulle piastre a diversa concentrazione di antibiotico a spot (0,5-0,7 mm di diametro) 2 µl della sospensione batterica di ogni singolo isolato. Ogni isolato è stato seminato in doppio. Le piastre sono state incubate a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ per 72 ore in microaerofilia arricchita d'idrogeno. I ceppi batterici testati sono stati processati evitando una loro esposizione alle concentrazioni atmosferiche d'ossigeno per un tempo superiore ai 20 minuti

Il valore di CMI è stato considerato come la più bassa concentrazione di un agente antimicrobico in grado di inibire completamente la crescita del batterio in esame.

C. jejuni ATCC 33560 è stato utilizzato come ceppo di controllo per tetraciclina, gentamicina, acido nalidixico, ciprofloxacina e cloramfenicolo.

Diversamente, le *stock solution* di eritromicina e ampicillina per i quali non erano disponibili limiti di accettabilità per *C. jejuni* ATCC 33560, sono state testate preliminarmente con i ceppi di referenza *S. aureus* ATCC 29213 ed *E. coli* ATCC 25922 seguendo le indicazioni del documento NCCLS M100-S14 (NCCLS, 2004).

Per la definizione delle resistenze sono stati utilizzati i seguenti breakpoint, sulla base delle indicazioni per l'uomo (NCCLS, 2004):

- cloramfenicolo $\geq 32 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,
- gentamicina $\geq 16 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,
- ciprofloxacina $\geq 4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,
- acido nalidixico $\geq 32 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,
- ampicillina $\geq 32 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,
- tetraciclina $\geq 16 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
- eritromicina $\geq 8 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Note: Modifiche apportate al protocollo delle diluizioni in agar descritto per *C. jejuni* e microrganismi correlati (NCCLS M31 A2, 2002)

Le modifiche apportate al protocollo hanno riguardato: (i) il terreno base; (ii) l'atmosfera impiegata; (iii) i tempi di lettura della prova.

Relativamente al terreno base il Muller Hinton agar 5% sangue ovino (MH) è stato sostituito con il Nutrient Broth N°2 (Oxoid) agarizzato 5% sangue ovino (NA). La necessità di sostituire il MH si è resa necessaria in quanto su questo terreno il 70% dei ceppi di campo e il ceppo tipo *H. pullorum* CIP 104787^T non erano in grado di crescere. La scelta NA è stata effettuata dopo aver valutato attentamente la produttività di questo terreno ed aver verificato che i componenti del terreno non interferissero con l'attività dell'antibiotico.

Per quanto riguarda l'atmosfera microaerofila, è stato deciso di utilizzare quella arricchita d'idrogeno, in quanto non tutti gli isolati crescevano in assenza di questo elemento, e i tempi di lettura sono stati prolungati da 48 ore a 72 ore in relazione ai tempi di crescita degli isolati di *H. pullorum* sul terreno privo di antibiotico.

Clonaggio e sequenziamento del gene *gyrA* di *H. pullorum* CIP 104787^T

Allo scopo di amplificare la regione QRDR del gene *gyrA* di *H. pullorum* CIP 104787^T sono stati disegnati dei primer degenerati (tabella 1) selezionati sulla base dell'allineamento nucleotidico delle sequenze di regioni conservate di GyrA di *H. hepaticus* ATCC 51449, *H. pylori* J99 e *C. jejuni* NCTC 11168 (numero di accesso GeneBank AE017125, AE001439 e AL111168 rispettivamente).

La PCR degenerata è stata eseguita su un volume di reazione di 50 µl contenente 100 ng di DNA templato, 1X HotMaster Taq Buffer (Eppendorf), 0,1 mgml⁻¹ di Bovine Serum Albumina (BSA, Fermentas), 200 µM di ogni deossinucleotide trifosfato (Eppendorf), 2 µM di ogni primer (dHp_{gyrA}F e dHp_{gyrA}R), 2 U di HotMaster Taq DNA polymerase (Eppendorf).

Il protocollo di amplificazione utilizzato è stato il seguente: 94°C per 3 min seguito da 5 cicli a 94°C per 1 min, 30°C per 1 min, 72°C per 1 min; 5 cicli a 94°C per 1 min, 35°C per 1 min, 72°C per 1 min; 20 cicli a 94°C per 1 min, 40°C per 1 min, 72°C per 1 min, e con un estensione finale di 72°C per 10 min.

Il prodotto della PCR ottenuto da *H. pullorum* CIP 104787^T è stato quindi clonato in pCR[®]-4-TOPO[®] plasmid vector utilizzando TOPO-TA cloning kit (Invitrogen), seguendo le istruzioni della casa costruttrice. Il DNA plasmidico è stato poi isolato e

purificato mediante Quantum prep[®] Plasmid Miniprep Kit[®] (Bio-Rad Laboratories) ed è stato sequenziato da Primm S.r.l. (Milano) in entrambe le direzioni utilizzando i primer universali M13.

La sequenza nucleotidica così ottenuta è stata tradotta e la sequenza aminoacidica dedotta è stata confrontata con le sequenze aminoacidiche di GryA di altri batteri depositate nei Database internazionali (GenBank-<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

La porzione del gene *gyrA* di *H. pullorum* CIP 104787^T “a monte” (*upstream*) e “a valle” (*downstream*) della regione nota di QRDR, precedentemente sequenziata, è stata ottenuta mediante *cassette ligation—mediated* PCR (Okuda *et al.*, 1999) utilizzando *Long and Accurate (LA) PCR in vitro cloning kit* (Takara) e successivo sequenziamento.

In breve, l'intero DNA cromosomiale di *H. pullorum* CIP 104787^T è stato digerito mediante *PstI* e *EcoRI* (Fermentas) ottenendo, in questo modo, frammenti di diverse dimensioni.

Gli enzimi di restrizione sono stati selezionati sulla base della sequenza nota di QRDR in modo da garantire che non riconoscessero siti di restrizione specifici all'interno di questa regione.

Successivamente, si è proceduto a legare alle estremità di ciascun frammento “cassette geniche” contenenti sequenze complementari ai primers C1 e C2 forniti dalla casa produttrice (Takara).

Tutti i frammenti di DNA cromosomiale avevano, a questo punto, estremità sia 5' terminale che 3' terminale, tutte uguali tra loro ed a sequenza nota.

Il DNA così ottenuto è stato utilizzato come template per una *nested LA* PCR (Takara) utilizzando le seguenti coppie di primer: C1- HpgyrA521R e C2 –

HpgyrA424R per amplificare la regione *upstream* a QRDR; C1- HpgyrA24F e C2 – HpgyrA74F per amplificare la regione *downstream* a QRDR.

Gli amplificati così ottenuti sono stati sequenziati da Primm S.r.l. (Milano) mediante strategia *primer walking*. Le fasi principali della *cassette ligation—mediated* PCR sono schematizzati in figura 1.

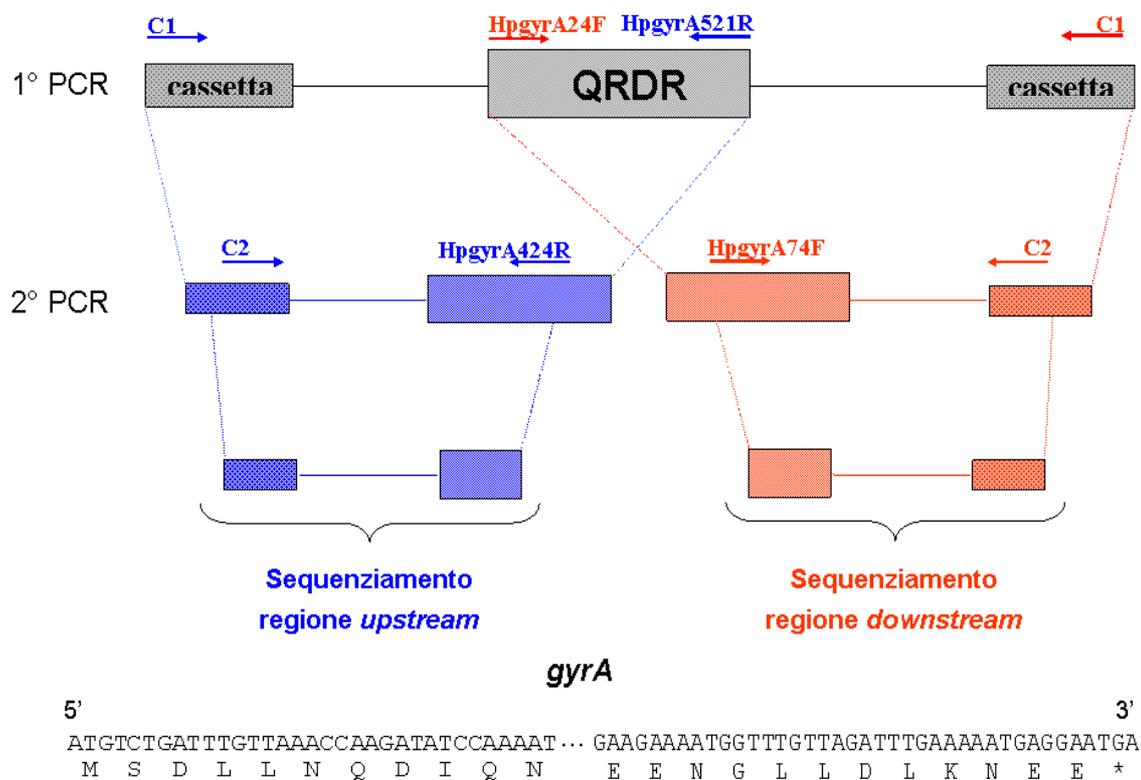


Figura 1. Schema riassuntivo delle diverse fasi della *cassette ligation—mediated* PCR utilizzata per ottenere la sequenza completa del gene *gyrA* di *H. pullorum* CIP 104787^T. C1 e C2 sono i primer complementari alle “cassette geniche” inserite nel frammento di DNA ottenuto mediante restrizione con *PstI* o *EcoRI*; HpgyrA521R e HpgyrA424R sono i primer utilizzati per amplificare la regione *upstream* a QRDR; HpgyrA24F e HpgyrA74F sono i primer utilizzati per amplificare la regione *downstream* a QRDR.

Tabella 1. Primers utilizzati in questo studio

PRIMER	SEQUENZE (5' to 3')	DIMENSIONI DELL'AMPLIFICATO (bp)
dHpgyrAF	CCTGTKCATAGRMGWATYTT	545
dHpgyrAR	TARATDATYCCACCWGTWGG	
HpgyrA24F	TGCAATGTATGAGCTTGGT	498
HpgyrA521R	TCTGGACCTTCAACAAATTG	
HpgyrA74F	CAAGAATCGTGGGTGATG	351
HpgyrA424R	GTGGAATATTTGTCCCA	

Amplificazione mediante PCR della QRDR dei ceppi di *H. pullorum* isolati da polli e tacchini

Le QRDR di *gyrA* dei diciotto isolati di *H. pullorum* da pollo e da tacchino sono state amplificate utilizzando la coppia di primer specifici HpgyrA24F-HpgyrA521R (tabella 1). La PCR è stata eseguita su un volume di reazione di 50 µl contenente 100 ng di DNA template, 1X HotMaster Taq Buffer (Eppendorf), 0,1 mgml⁻¹ di BSA (Fermentas), 200 µM di ogni deossinucleotide trifosfato (Eppendorf), 0,5 µM di ogni primer, 2,5 U di HotMaster Taq DNA polymerase (Eppendorf).

Il protocollo di amplificazione utilizzato è stato il seguente: 94°C per 3 min seguito da 30 cicli a 94°C per 1 min, 50°C per 1 min, 72°C per 1 min e con un estensione finale di 72°C per 10 min.

Gli amplificati sono stati sequenziati da Primm S.r.l. (Milano) in entrambe le direzioni utilizzando gli stessi primer della PCR.

Le sequenze così ottenute sono state comparate mediante allineamento multiplo con la sequenza di QRDR di *gyrA* di *H. pullorum* CIP 104787^T.

Trasformazione di *H. pullorum*

Allo scopo di dimostrare se la mutazione osservata nei ceppi resistenti di *H. pullorum* fosse realmente in grado di conferire resistenza verso i fluorochinoloni, il ceppo *H. pullorum* CIP 104787^T, sensibile alla ciprofloxacina, è stato sottoposto ad un protocollo di trasformazione come descritto da Moore *et al.* (1995).

Viene di seguito descritto in breve il protocollo di trasformazione utilizzato.

Il ceppo *H. pullorum* CIP 104787^T, sensibile alla ciprofloxacina, sottoposto alla trasformazione, verrà definito “ceppo ricevente”; mentre i ceppi di campo di *H. pullorum* HP2, HP3 e HP7, resistenti sia alla ciprofloxacina che all’acido nalidixico, saranno definiti “ceppi donatori”.

Il ceppo ricevente è stato seminato su Difco-Brucella Agar (BD) 5% sangue ovino, incubato in microaerofilia con idrogeno per 48 ore. Il ceppo è stato poi subcoltivato su una nuova piastra in quattro aree di circa 1 cm² e incubato nuovamente nelle stesse condizioni per una notte. Al termine dell’incubazione, 10 µl di una soluzione contenente 10 ng dell’amplificato della QRDR di ciascun ceppo donatore sono stati applicati su ciascuna area di semina di 1 cm². Parallelamente come controllo negativo su un'altra area di semina sono stati applicati 10 µl di H₂O ultrapura-HPLC (Sigma) sterile. Successivamente la piastra è stata reincubata per altre 24 ore. Al termine dell’incubazione è stata eseguita una conta in parallelo su Difco-Brucella Agar 5% sangue ovino addizionato o meno di 4 µg/ml di ciprofloxacina sia del ceppo sottoposto a trasformazione che del controllo negativo.

La frequenza di mutazione è stata valutata calcolando il rapporto tra il numero di colonie ottenute sul terreno contenente ciprofloxacina ed il numero di colonie nel

terreno senza ciprofloxacina. La frequenza di mutazione spontanea attesa per il controllo negativo doveva risultare di almeno 2log più bassa di quella osservata per il ceppo ricevente trasformato.

Per verificare l'avvenuta trasformazione, la QRDR di *gyrA* del ceppo ricevente trasformato è stata sequenziata come descritto precedentemente.

Analisi delle sequenze

Le sequenze di *gyrA* di *H. pullorum* sono state analizzate mediante: **BLASTn** e **BLASTp** (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) per la ricerca di omologie in GenBank; **MEGA3** (www.megasoftware.net) per la traduzione delle sequenze nucleotidiche in sequenze aminoacide e per l'allineamento multiplo mediante **CLUSTALW**; **ORF finder** (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf>) per la determinazione dell'Open Reading Frame; **BPPROM** (<http://www.softberry.com>) per la valutazione dei ipotetici promotori batterici del gene *gyrA*.

4.3 Risultati

Antibiotico resistenza in *H. pullorum*

Nella tabella 2 sono illustrate le distribuzioni dei valori di CMI dei sette antibiotici testati per i 74 isolati di *H. pullorum* di campo e il ceppo *H. pullorum* CIP 104787^T.

Una distribuzione monomodale dei valori di CMI è stata osservata per ampicillina, cloramfenicolo, acido nalidixico e gentamicina.

Diversamente una distribuzione multimodale è stata osservata per ciprofloxacina, tetraciclina ed eritromicina indicando per questi farmaci una resistenza acquisita.

Tabella 2. Distribuzioni dei valori di CMI per 74 ceppi di *H. pullorum* e del ceppo tipo *H. pullorum* CIP 104787^T

Antibiotici	Numero di isolati di <i>H. pullorum</i> con CMI di $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$:															
	<0,015	0,015	0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	>128
ampicillina							3	9	17	27*	14	4	1			
cloramfenicolo								2	4	14*	35	19	1			
ciprofloxacina	3		1	2	14*	12	7	1				7	11	11	5	1
acido nalidixico										2	13*	21	13	16	9	1
tetraciclina					3	9*	14	14	15	9			1	3	6	1
gentamicina				1	19	38*	17									
eritromicina	2				4	8	14*	5	8	3	3					28

*: valore di CMI per *H. pullorum* CIP 104787^T

I valori di CMI per ciprofloxacina si distribuiscono in tre picchi uno a $< 0,015 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, il secondo tra $0,03$ e $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e un terzo picco tra 16 e $>128 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Tetraciclina presenta due picchi uno che varia da $0,12$ a $4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e un secondo che varia da 32 a $>128 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Infine, i valori di CMI per eritromicina si distribuiscono su tre picchi un a $< 0,015 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, il secondo che varia tra $0,12$ e $8 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ed il terzo a $>128 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Gli isolati di *H. pullorum* da galline ovaiole presentano una distribuzione monomodale delle CMI per tutti gli antibiotici testati.

Secondo i breackpoint considerati, tutti gli isolati di *H. pullorum* testati sono risultati sensibili a gentamicina mentre il 52% sono risultati resistenti all'acido nalidixico, il 46,7% alla ciprofloxacina, il 41,3% alla eritromicina, il 14,7% alla tetraciclina, il 1,3% all'ampicillina e al cloramfenicolo.

Analisi della sequenza del gene *gyrA* di *H. pullorum*

La PCR eseguita utilizzando i primers degenerati *dHpgyrAF* e *dHpgyrAR* ha permesso di amplificare da *H. pullorum* CIP 104787^T un frammento di 545 bp. La sequenza aminoacidica dedotta di 181 aa del frammento amplificato ha presentato un'identità del 78% e 86% quando comparata con un frammento analogo contenente QRDR di *gyrA* rispettivamente di *H. hepaticus* ATCC 51449 (Accession number AE017125) e *H. pylori* UC946 (Accession number L29481); un'identità del 83% e 73% quando comparata con le sequenze di *gyrA* di *W. succinogenes* DSM 1740 (Accession number NC005090) e *C. jejuni* NCTC 11168 (Accession number AL111168).

Questi risultati confermano che il prodotto di PCR di 545 bp rappresenta una porzione del gene *gyrA* di *H. pullorum* e che questa porzione contiene la QRDR.

L'analisi della sequenza del frammento di 545 bp ha permesso di disegnare due set specifici di *primers* (tabella 1): HpgyrA24F-HpgyrA521R e HpgyrA74F-HpgyrA424R.

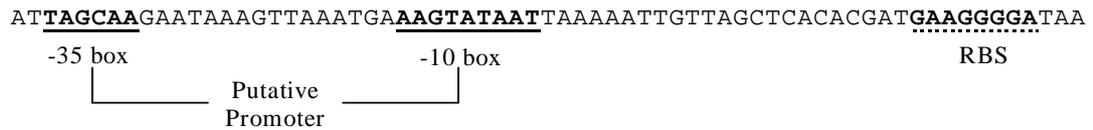
Questi *primers* sono stati successivamente utilizzati nella *cassette-ligation mediated* PCR che ha permesso di ottenere la sequenza completa del gene *gyrA* da *H. pullorum* CIP 104787^T, presentato nella figura 2b.

La sequenza di *gyrA*, di 2490 bp, presenta un ORF che codifica per 829 aminoacidi. A monte di questo ORF sono state individuate sequenze (figura 1a) probabilmente riferibili a *putative ribosomal binding site* (RBS) e al promotore batterico (Shine e Dalgarno, 1974). La sequenza aminoacidica di 829 aa di GyrA di *H. pullorum* CIP 104787^T ha mostrato il 76% e il 73% di identità quando comparata rispettivamente con GyrA di *H. hepaticus* e *H. pylori* e del 83% e 68% rispetto a GyrA di *W. succinogenes* e *C. jejuni*.

La sequenza aminoacidica della QRDR (figura 2a) di GyrA di *H. pullorum*, compresa tra il codone 68 e 108, è risultata identica a quella di *H. hepaticus* e di *W. succinogenes* e ha mostrato un'identità del 98%, 83% e 80% nei confronti rispettivamente di QRDR di *H. pylori*, *C. jejuni* e *E. coli*.

La sequenza totale di *gyrA* di *H. pullorum* CIP 104787^T e la relativa sequenza di QRDR sono state depositate in GenBank con i seguenti numeri di accesso: DQ836338 e DQ675017 rispettivamente.

a)



b)

```

1      ATGCTGATTGTTAAACCAAGATATCCAAAATGTCATATGAAGATTCTATTAAGAAAGCATCTTGATTATTCATGAGTGTATAGTTGGACGCGCATTGCCAGATGCAAGAGAT
1      M S D L L N Q D I Q N V N I E D S I K E S Y L D Y S M S V I V G R A L P D A R D
121    GGTCTAAACCTGTGCATAGAAGATTTTATATGCAATGTATGAGCTGGTGTAACTTCAAAGCTAAGTATAAAAAGCTCSCAAGAATCGTGGGTGATTAAGTAAATACCCCT
41      G L K P V H R R I L Y A M Y E L G V T S K A K Y K K S A R I V G D V I G K Y H P
241    CACGGAGATACAGCTGTTATGATGCACTTGTAGATGGCACAAGATTTCTATCGGTTTAGAGCTTGTGATGGACAAGGAACTTTGGTAGTATTGGAGGATAGTGCCTGCTGCT
81      H G D T A V Y D A L V R M A Q D F S M R L E L V D G Q G N F G S I D G D S A A A
361    ATCGGTATACAGAACCAAAAATGACACAAGCGGCAGAAAGTTTTGAGAGATATTGATAAAGATACAGTAGATTTCTCCCTAATTATGATGATACACTAAAAGCCAGATATCTTT
121    M R Y T E A K M T Q A A E E V L R D I D K D T V D F L P N Y D D T L K E P D I L
481    CCAAGTCGTTGCCAAATTTGCTTATTAATGGCTTAATGGGATTCGCTGGGTATGGCGACAATATCCACCCACAGAGTAGATGAAATATTGATGCTTTGGTGTATTGATGAT
161    P S R L P N L L I N G S N G I A V G M A T N I P P H R V D E I I D A L V Y L I D
601    AATCCCAAGCAGAATTAACGAAATTTGCAATTTGTTGAAGTCCAGATTTTCCCAACAGGTGATTATCTATGTTAAAATGGAATAAGAGAGGCTTATGAACAGGAGAGGGCGC
201    N P K A E L N E I L Q F V E G P D F P T G G I I Y G K N G I R E A Y E T G R G R
721    ATTAAGTCGTCGCAAAACACATATTGAAAAACCAAAACAAAAGATATTATTGTAATTGATGAGATTCCCTATCAGGTCAATAAAGCAAGACTTTGATAGCAAAATGCTGAATTAGCC
241    I K V R A K T H I E K T K T K D I I V I D D E I P P Y Q V N K A R L V E Q I A E L A
841    AAAGAGAAGTTATTGAAGCATTCTGAAGTGCCTGATGAATCCGATAGAGAGGGGATTAGAGTGTATTGAGCTAAAACGAGAGGCAATGAGCGAGATTGTGCTTAATCACCTTTT
281    K E K V I E G I S E V R D E S D R E G I R V V I E L K R E A M S E I V L N H L F
961    AAATCAACCCCTATGGAAAGTACTTTGGTATTATTTGCTTCAATTTATAACAAGAGCCAAAATATTCACTTTTGGAGTTGTTGGGATTATTATTCTCATCCCAAAAGCGTA
321    K S T P M E S T F G I I L L A I Y N K E P K I F T L L E L L G L F I S H R K S V
1081   GTAATAAGACCAACAATTTTGAATTAGAAAAGCTAAGGCTAGAGCGCATATTTGGAGGATTAAGAATAGCCTTAGAAAATATTGATGAATTTCTTTGATACGCTCAAGTAGC
361    T Y I R R T A V F E L E K A K A R A H I L E G L R I A L E N I D E I V S L I R S S S
1201   GATCCAAAGTAGCCAAAGAAGGCTTAATTTCTCAATTAATCTAAGTGAATCCAAAGCACAAGCAATTTAGATATGCGATTGCAAAAGATTGACAGGTTGGAGAGAGAAAAAATCGAA
401    D P K V A K E G L I S Q F N L S E I Q A Q A I L D M R L Q R L T G L E R E K I E
1321   AATGAATACCAAGAATTAAGCAAAATTTGAATTTAAATTTCAATTTCTAAGAGCGGATTTGCTTAATAAAATCATCAAGAAGAATTTAGAAAGTCAAAAGAAATTTAGCACA
441    N E Y Q E L L K E I E Y L N L I R S E D L L N K I I K E E L L E V K E F S T
1441   AAACGACTGACTGCTATTGAAGAAGATTATGAAGCATTGATATGAAGATTGATTCTAATGAAGCGGTAGTTGTAACAATGAGTCACTCGGTGATATGTAAGAGAGTCCGGTTCGA
481    K R L T A I E E D Y E S I D M E D L I P N E A V V V T M S H R G Y V K R V P V R
1561   ACCTATGAAAACAAAATAGGGGAGGCAAGGAAAATTTCTGCTAACCCCATGATGATGATTTTATAGAGAGCTTTTTTGTATCTGATACGCAGCATACAATAATGTTTACTACTAAT
521    T Y E K Q N R G G K K I S A N T H D D I D D F I E S F F V S D T H D T I M F I T N
1681   AAAGGCAATGCTATTGGTTGAAGTTTATAAGATTCCAGAAGCTAGTCGACAGCAATTTGGGAAAGCTGTTGTAATCTTATCAATCTAGCACCTGATGAAAGATTATGCAACCATC
561    K G Q L Y W L K V Y K I P E A S R T A I G K A V V N L I N L A P D E K I M A T I
1801   ACAACAAGAGTTTAAAGAGATAAATCTATCGGTTTTTACCAAAAATGGTATTATCAACAGCCTAATTTAAGTGAATTTAAAAATTTAGAAGTTTGGAGTTAGGCAATTAAT
601    T T K D F N E D K S I A F P T K N G I I K R T N L S E F K N I R S V G V R A I N
1921   TTAGATGAAAATGATGAGCTTGAATGCAAAAATCATTCTCCAGCAATCCAGCAAAATTTGGTAGTAACCTATGAAAGTATGTGTGTAAGATTAGCGTTGATAATGTGCGGTGAGATT
641    L D E N D E L V T A K I I S P A I Q Q I L V V T Y E G M C V R F S V D N V R E I
2041   GGTAGAGTGCACGAGGGTACTGCTATTAAATTTAAAATACAAAAGACTATGTAATTTGGTCAACAGTGGTTTCTAATGAAAATGAGGAAATTTAAGCGTAAAGTAAAAGGAATA
681    G R V A R G V T A I K F K I P K D Y V I G A T V V S N E N E E I L S V S E K G I
2161   GGAACACGCACAGAAATCAATGAATATAGAAATCAAAATCGTGGTGAAGGCGTATTGCTAAGACTAATAGCAAAACAGGAAAATTAGTTGGCTAGTCAATGTAGATGAAAAT
721    T N R T E I N E Y R I T N R G G K V I A M K L T S K T G K L V G V N V D E N
2281   ATGGATTAATGGTCTTACTTCTAGTGGAAAGATGATACCGTAGATATGCAACAATCCGCAAGCAGGACGCGCTACAGTGGAGTTATTATTGTAATGTCGATGATAAGGTT
761    M D L M V L T S S G K M I R V D M Q T I R K A G R A T S G V I I V N V D D D K V
2401   GTTTCATAGCAGGTTGTCAAAAGAGGAAAAGAAGAAGTAATCGAAGAAGAAAATGGTTTGTAGATTGAAAATGAGGAATGA
801    V S I A R C P K E E K E E V I E E N G L L D L K N E E *

```

Figura 2. Sequenza nucleotidica del gene *gyrA* di *H. pullorum* Cip 104787^T (Accession number DQ836338): a) sequenza nucleotidica *upstream* al gene *gyrA* contenente il promotore e la regione RBS (ribosomal binding site); b) sequenza nucleotidica e sequenza aminoacidica dedotta del gene *gyrA* (2490 bp). Il codone di stop è stato evidenziato con un asterisco. La regione QRDR è stata evidenziata in grigio.

68	ARIVGDVIGKYHPHGD	TAVYDALVLRMAQDFSMRLELVDGQ	<i>H. pullorum</i>
68	ARIVGDVIGKYHPHGD	TAVYDALVLRMAQDFSMRLELVDGQ	<i>H. hepaticus</i>
70	ARIVGDVIGKYHPHGD	TAVYDALVLRMAQDFSMRLELVDGQ	<i>W. succinogenes</i>
70	ARIVGAVIGRYHPHGD	TAVYDALVLRMAQDFSMRYPSITGQ	<i>C. jejuni</i>
71	ARIVGDVIGKYHPHGD	NAVYDALVLRMAQDFSMRLELVDGQ	<i>H. pylori</i>
67	ARVVGDVIGKYHPHGD	SAVYDTIVRMAQPFSLRYMLVDGQ	<i>E. coli</i>

Figura 3. Alienamento delle sequenze aminoacidiche di QRDRs di GyrA di *H. pullorum* CIP 104787^T, *H. hepaticus* ATCC 51449, *W. succinogenes* DSM 1740, *H. pylori* UC946, *C. jejuni* NCTC 11168 e *E. coli* K12 (accession numbers DQ836338, AE017125, NC_005090, L29481, AL111168 and U00096 rispettivamente). Le sostituzioni aminoacidiche sono evidenziate in grigio.

Caratterizzazione di mutazioni in *gyrA* negli isolati di *H. pullorum* da pollo e da tacchino

La caratterizzazione delle mutazioni nella QRDR del gene *gyrA* degli isolati di *H. pullorum* da pollo e da tacchino sono riportate nella tabella 3. La coppia di primer HpgyrA24F e HpgyrA521R sono risultati altamente specifici in quanto in grado di amplificare un segmento di 498 bp, contenente la QRDR del gene *gyrA*, da tutti gli isolati di campo di *H. pullorum* testati mentre nessun amplificato è stato ottenuto da *Helicobacter canadensis* CCUG 47163^T. La sequenza aminoacidica della QRDR di tutti gli isolati sensibili alla ciprofloxacina, indipendentemente dalla loro sensibilità verso l'acido nalidixico è risultata identica a quella ottenuta da *H. pullorum* CIP 104787^T. Diversamente, tutti gli isolati resistenti alla ciprofloxacina hanno presentato una sostituzione ACA→ATA (Thr→Ile) a livello del codone 84, anche in questo caso indipendentemente dalla sensibilità all'acido nalidixico.

Trasformazione di *H. pullorum*

La sostituzione ACA→ATA (Thr→Ile) osservata negli isolati ciprofloxacina-resistenti è stata confermata funzionalmente mediante la trasformazione di *H. pullorum* CIP 104787^T. La presenza della mutazione puntiforme in posizione 84 dei trasformati ciprofloxacina-resistenti è stata confermata mediante PCR e successivo sequenziamento. Nove diverse colonie (tre per ogni donatore) casualmente selezionate tra quelle trasformate hanno presentato sostituzione ACA→ATA in posizione 84, dimostrando come la mutazione Thr84Ile sia responsabile dell'acquisizione della resistenza verso ciprofloxacina in *H. pullorum*.^T

Tabella 3. Caratterizzazione delle mutazioni in *gyrA* del ceppo *H. pullorum* CIP 104787^T e di 18 ceppi di *H. pullorum* di campo isolati da pollo e da tacchino

Isolati	Provenienza	CMI ($\mu\text{g ml}^{-1}$) ^a		<i>gyrA</i> mutation		
		CIP	NA	Codone	Cambiamento di base	Cambiamento di aminoacido
<i>Isolati ciprofloxacina-sensibili</i>						
CIP 104787 ^T	Uomo	0.12	8	- ^b	-	-
HP6	Pollo	0.25	4	-	-	-
HP8	Pollo	<0.015	4	-	-	-
HP1	Pollo	0.12	8	-	-	-
HP17	Tacchino	0.5	16	-	-	-
HP9	Pollo	0.25	32	-	-	-
HP12	Tacchino	0.25	32	-	-	-
HP5	Pollo	0.25	64	-	-	-
<i>Isolati ciprofloxacina-resistenti</i>						
HP14	Tacchino	16	64	84	ACA→ATA	Thr→Ile
HP2	Pollo	32	32	84	ACA→ATA	Thr→Ile
HP3	Pollo	32	32	84	ACA→ATA	Thr→Ile
HP4	Pollo	32	32	84	ACA→ATA	Thr→Ile
HP15	Tacchino	32	16	84	ACA→ATA	Thr→Ile
HP10	Tacchino	32	128	84	ACA→ATA	Thr→Ile
HP16	Tacchino	64	32	84	ACA→ATA	Thr→Ile
HP18	Tacchino	64	64	84	ACA→ATA	Thr→Ile
HP11	Tacchino	128	64	84	ACA→ATA	Thr→Ile
HP7	Pollo	128	128	84	ACA→ATA	Thr→Ile
HP13	Tacchino	128	128	84	ACA→ATA	Thr→Ile

^a CIP, ciprofloxacina; NA, acido nalidissico;

^b, nessun cambiamento

4.4 Discussione

Gli unici dati di antibiotico-resistenza basati sulla determinazione delle CMI per *H. pullorum* sono quelli descritti da Ceelen *et al.* (2005b). Questi autori hanno condotto uno studio valutando l'attività *in vitro* di 13 antibiotici su 23 ceppi isolati da solo 3 differenti allevamenti di broiler in Belgio. Gli autori hanno descritto una distribuzione bimodale dei valori di CMI solo per la spectinomicina mentre per i restanti 12 antibiotici, tra cui ampicillina, enrofloxacin e eritromicina, hanno osservato distribuzioni monomodali.

Diversamente da questi autori, le distribuzioni dei valori di CMI da noi osservati su 74 ceppi di *H. pullorum* isolati da 74 diversi allevamenti italiani di pollo, tacchino e struzzo, indicano una resistenza acquisita per ciprofloxacina, eritromicina e tetraciclina.

Livelli analoghi di resistenza per questi farmaci sono stati osservati in ceppi di *C. jejuni* e *C. coli* isolati da pollo e tacchino in allevamenti di diversa tipologia in Europa e negli Stati Uniti (Moore *et al.*, 2006). Questi dati confermano che il largo impiego di queste molecole nell'allevamento avicolo ha contribuito alla selezione ed al mantenimento di ceppi resistenti potenzialmente patogeni per l'uomo nella flora enterica di questi animali.

Ceelen *et al.* (2005b), determinarono per ampicillina una CMI₉₀ pari a 256 µg·ml⁻¹ associata ad una distribuzione monomodale con un range di valori compresi tra 32 e >512 µg·ml⁻¹, indicando per *H. pullorum* una resistenza intrinseca a questa molecola. Il valore di CMI₉₀ da noi ottenuto per ampicillina risulta essere invece pari a 8 µg·ml⁻¹ con una distribuzione monomodale definita da un range di valori, tra 0,5 e 32 µg·ml⁻¹.

Questi dati suggeriscono che i valori di CMI osservati per i ceppi di *H. pullorum* isolati in Belgio si riferiscono probabilmente ad una resistenza acquisita in seguito ad una pressione di selezione e non ad una resistenza naturale del battere.

Le differenze riscontrate tra i nostri dati e quelli riportati da Ceelen *et al.* (2005b) sono probabilmente da attribuire al numero esiguo di allevamenti analizzati dagli autori belgi. Per esempio, i ceppi belgi di *H. pullorum* i cui valori di CMI costituivano il secondo picco della streptomicina a $8 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, erano stati isolati da animali appartenenti allo stesso allevamento. Questo fatto conferma l'importanza di studiare un numero elevato di ceppi non strettamente correlati epidemiologicamente al fine di ottenere dati attendibili sulla distribuzione delle resistenze all'interno di una popolazione batterica.

Un particolare interessante che emerge dalla disamina dei dati ottenuti da Ceelen *et al.* (2005b) è il rilievo che ceppi isolati nello stesso allevamento, strettamente correlati genotipicamente (Ceelen *et al.*, 2006c), presentassero valori di CMI differenti per gli stessi antibiotici.

La mancanza di un metodo standard impiegabile per lo studio dell'antibiotico-resistenza negli epsilonbatteri e in particolare in *H. pullorum*, limita la comparazione dei dati ottenuti da diversi laboratori. Il protocollo per la definizione delle CMI da noi utilizzato è stato definito sulla base di quello proposto dal Clinical Standard Laboratory Institute (CSLI, precedentemente chiamato NCCLS) per *C. jejuni* e microrganismi correlati. Le modifiche da noi apportate non hanno alterato la riproducibilità del metodo e ciò è testimoniato dal fatto che i valori di CMI del ceppo di controllo *C. jejuni* ATCC 33560 da noi ottenuti sono sempre caduti all'interno dei range di accettabilità definiti nel documento originale.

Gli isolati di *H. pullorum* da pollo e da tacchino provenienti da allevamenti italiani hanno mostrato un elevato livello di resistenza verso ciprofloxacina con valori di CMI compresi tra 16 e >128 µg·mL⁻¹. Alla luce di questo dato è stato ritenuto opportuno, visto il largo impiego di questo chemioterapico sia in medicina umana sia in ambito veterinario, determinare il meccanismo molecolare legato alla resistenza in *H. pullorum*.

L'attività di ricerca relativa a questa problematica ha permesso di sequenziare l'intero gene *gyrA* di *H. pullorum* CIP 104787^T e di identificare mutazioni puntiformi nella QRDR di *gyrA* in ceppi di campo di *H. pullorum* legati alla resistenza a ciprofloxacina.

La *Cassette-ligation mediated* PCR (Okuda *et al.*, 1999) è risultato essere un metodo idoneo per determinare l'interna sequenza del gene *gyrA* e dei relativi promotori di *H. pullorum* CIP 104787^T.

La sequenza del gene *gyrA* di *H. pullorum* ha mostrato, inaspettatamente, un maggior livello di similarità con *gyrA* di *Wolinella succinogenes* (83%) piuttosto che con altri *Helicobacter*: *H. hepaticus* (76%) e *H. pylori* (72%). Confrontando la sequenza aminoacidica della QRDR di *H. pullorum* con quella di altre specie batteriche Gram negative è risultato che questa è identica a quella di *W. succinogenes* e di *H. hepaticus* evidenziando una stretta relazione tra questi batteri. Inoltre la sequenza di *gyrA* è risultata identica all'80% a quella di *E. coli*, confermando come questa regione sia altamente conservata.

L'alto livello di similarità riscontrato tra *gyrA* di *H. pullorum* e di *W. succinogenes* è in accordo con quanto già descritto da Stanley *et al.* (1994) e Dewhirst *et al.* (2005), i quali dimostrarono una stretta relazione tra queste due specie mediante rispettivamente lo

studio del profilo proteico totale e l'analisi filogenetica del gene ribosomiale 23S rRNA. Questi dati suggeriscono la necessità di una rivalutazione tassonomica dei generi *Helicobacter* e *Wolinella*, come già suggerito da Dewhirst *et al.* (2005).

I primers utilizzati in questo studio per l'amplificazione della QRDR di *gyrA* di *H. pullorum*, mostrano un alto livello di specificità verso questa specie, fallendo nel amplificare la QRDR di *H. canadensis*. Questo risultato suggerisce la possibile applicazione di questa PCR per discriminare queste due specie di *Helicobacter*.

Solo un tipo di mutazione puntiforme in posizione 84 (Thr→Ile) è stata determinata nella QRDR di *gyrA* di tutti gli isolati di *H. pullorum* da pollo e da tacchino che presentavano resistenza nei confronti di ciprofloxacina.

Questa posizione corrisponde in *gyrA* al codone 86 in *C. jejuni*, al codone 87 in *H. pylori*, al codone 85 in *A. butzleri* e al codone 83 in *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli*, *Salmonella enterica* serovars Enteritidis e Typhimurium (Yoshida *et al.*, 1988; Piddock *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 1993; Griggs *et al.*, 1994; Moore *et al.*, 1995; Mouneimné *et al.*, 1999; Abdelbaqi *et al.*, 2007).

La mutazione Thr86Ile è stata frequentemente osservata in ceppi di *C. jejuni* con elevati livelli di resistenza ai fluorochinoloni (Wang *et al.*, 1993). Allo stesso modo Thr87Ile e Thr85Ile sono state confermate essere funzionalmente associate a resistenza verso i fluorochinoloni in *H. pylori* (Moore *et al.*, 1995) e *A. butzleri* (Abdelbaqi *et al.*, 2007). Nelle *Enterobacteriaceae* il codone 83 rappresenta "hot spot" per le mutazione in *gyrA* e le principali sostituzioni associate a resistenza o diminuzioni di sensibilità verso fluorochinoloni sono Ser83Ala o Ser83Phe (Yoshida *et al.*, 1988; Piddock *et al.*, 1993; Griggs *et al.*, 1994).

Nessuna sostituzione è stata ritrovata in *gyrA* di *H. pullorum* in corrispondenza al codone 88 (correlato al residuo Asp91 in *H. pylori*), sostituzione invece frequentemente riportata in *H. pylori* (Moore *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 2001) quale sito di mutazione in grado di conferire resistenza ai fluorochinoloni,.

In questo studio è stata dimostrata, mediante trasformazione, la relazione tra la sostituzione Thr84Ile e la resistenza verso i fluorochinoloni in *H. pullorum* confermando la rilevanza delle mutazioni di questo codone nell'acquisizione della resistenza verso i fluorochinoloni dei batteri gram negativi.

È interessante notare che nessuna mutazione è stata trovata nella QRDR di *gyrA* negli isolati di *H. pullorum* sensibili alla ciprofloxacina ma resistenti all'acido nalidixico (isolati: HP5, HP9 e HP12). Come già osservato in *C. jejuni* (Oyarzabal *et al.*, 2007), l'acquisizione della resistenza per i chinoloni sembra stabilirsi indipendentemente da quella dei fluorochinoloni e sembra possa essere correlata a diverse cause: (i) mutazioni puntiformi in *gyrA* ma non comprese nella QRDR; (ii) mutazioni puntiformi in altri siti target (come per esempio la sub-unità beta della DNA girasi- *gyrB*); (iii) mutazioni puntiformi legate ad una sovraespressione del sistema delle pompe di efflusso o ad un'inibizione dei geni codificanti proteine di membrana (purine).

È interessante sottolineare che per il ceppo HP15 isolato da tacchino è risultato essere resistente alla ciprofloxacina e sensibile all'acido nalidixico (CMI di 16 µgml⁻¹), è stato possibile identificare solo la mutazione Thr86Ile come per gli altri ceppi ciprofloxacina resistenti. Fenotipi di resistenza simili sono stati osservati in *Staphylococcus aureus* (Piddock *et al.*, 2002) e in *E. coli* (Moniot-Ville *et al.*, 1991) ed associati ad un ridotto *uptake* del fluorochinolone e a mutazioni in *gyrA*. Questi dati

indicano come la resistenza verso i chinoloni e i fluorochinoloni è acquisita probabilmente mediante meccanismi indipendenti anche per *H. pullorum*.

Nessuna correlazione è stata osservata per *H. pullorum* tra numero e tipo di mutazioni in QRDR di *gyrA* e valori di CMI per la ciprofloxacina nei diversi isolati testati. Questo fatto suggerisce che altri meccanismi molecolari quali l'aumento dell'attività delle pompe di efflusso o/e una diminuita permeabilità di membrana sono implicati probabilmente nell'acquisizione della resistenza verso ciprofloxacina.

CONCLUSIONI

La discussione e le considerazioni dei risultati esposti nella presente tesi, sono riportati nei singoli capitoli relativi a specifici argomenti di ricerca.

In sintesi vengono di seguito riportati gli obiettivi raggiunti, che hanno permesso di aumentare le conoscenze relative a *Helicobacter pullorum* quale possibile agente zoonosico emergente:

- La prevalenza di *H. pullorum* in Italia nel pollo e nel tacchino è risultata molto elevata: nel 96,4% degli allevamenti campionati è stato possibile individuare almeno un animale positivo.
- Per la prima volta *H. pullorum* è stato isolato da tacchino e struzzo dimostrando un'ampia diffusione di questo microrganismo nelle specie di uccelli allevati a scopo alimentare.
- Il protocollo d'isolamento da noi ottimizzato basato sul metodo della membrana filtrante (Steele e McDermott, 1984) è risultato molto sensibile e adatto per definire la prevalenza di *H. pullorum* nelle specie avicole permettendo di ottenere un numero molto elevato di isolati (306).
- La tipizzazione genotipica ha permesso di confermare la variabilità intraspecifica in *H. pullorum* evidenziando uno scarso andamento clonale, anche se è stato possibile osservare che alcuni cloni sono distribuiti su più allevamenti.
- Non è stato possibile ottenere isolati di *H. pullorum* da feci umane.
- Le distribuzioni dei valori delle concentrazioni minime inibenti definiti su un numero di ceppi elevati di *H. pullorum* provenienti da tutti gli allevamenti

positivi appartenenti a indicarono una resistenza acquisita per ciprofloxacina, eritromicina e tetraciclina.

- l'acquisizione di resistenza verso ciprofloxacina in *H. pullorum* è legata a mutazione nella QRDR di *gyrA* e in modo particolare alla sostituzione Thr86Ile, mutazione frequentemente segnalata in altre specie della stessa classe associata a elevati livelli di resistenza ai fluorochinoloni;
- l'acquisizione di resistenza verso i chinoloni e i fluorochinoloni in *H. pullorum*, come in altre specie batteriche, sembra avvenire mediante meccanismi indipendenti.

Tutte le diverse attività di ricerca svolte nella presente tesi sono state oggetto delle pubblicazioni scientifiche e delle comunicazioni a convegno qui di seguito elencate:

- Zanoni R.G., **Rossi M.**, Giacomucci D., Sanguinetti V., Manfreda G., (2007). Occurrence and antibiotic susceptibility of *Helicobacter pullorum* from broiler chickens and commercial laying hens in Italy. *Int. J. Food Microbiol.* **116**: 168-173.
- Pasquali F., **Rossi M.**, Manfreda G., Zanoni R. (2007). Complete nucleotide sequence of the *gyrA* gene of *Helicobacter pullorum* and identification of a point mutation leading to ciprofloxacin resistance in poultry isolates. *Int. J. Ant. Agents.*:222-228

- **Rossi M.**, Sanguinetti V., Gavioli R., Lozito P., Manfreda G., Zanoni R.G., (2006). Prevalence of *Helicobacter pullorum* in broiler chickens in northern Italy. Gut Microbiology: research to improve health, immune response and nutrition, Aberdeen, Scotland, UK 21-23/06/2006. *Rep. Nut. Dev.* **46 (Suppl.1)**: S28.
- Manfreda G., **Rossi M.**, Sanguinetti V., Gavioli R., Lozito P., De Cesare A., Zanoni R.G., (2006). Prevalence of *Helicobacter pullorum* in broiler chickens in reared in intensive and extensive farms. XII European Poultry Conference, Verona, Italy, 10-14/09/2006. *World Poultry Sci. J.* **62** (supplement): 551-552.
- Pasquali F., **Rossi M.**, Zanoni R.G, Manfreda G., (2006). Cloning and nucleotide sequence of *Helicobacter pullorum* NCTC 12824 partial DNA gyrase *gyrA* gene. XII European Poultry Conference, Verona, Italy, 10-14/09/2006. *World Poultry Sci. J* **62** (supplement): 569-570.
- **Rossi M.**, Manfreda G., Lucchi A., Revez J., De Cesare A., Zanoni R.G. (2007). Occurrence and antibiotic susceptibility of *Helicobacter pullorum* from turkeys intensively reared in northern Italy. CHRO2007, Rotterdam, 2-5 Settembre 2007. *Zoonoses and Public Health.* **54 Issue s1**: iv-165.

RINGRAZIAMENTI

Prima di tutto vorrei ringraziare i miei genitori e tutta la mia famiglia per l'appoggio e l'affetto che mi hanno dimostrato in questi anni.

Vorrei ringraziare anche tutto il personale docente e tecnico del Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale che in questi anni mi hanno sopportato e con il loro lavoro hanno reso possibile lo svolgimento di questa tesi:

In modo particolare vorrei ringraziare: il Prof. Zanoni e la Prof.ssa Sanguinetti per la loro guida e per avermi fatto amare profondamente questa materia; Monica per l'incredibile amicizia (e tutto quello che questo significa); Cristina per l'amicizia, l'affetto e tutti i lunghi viaggi in treno (.. quanti racconti!!); Silvia per l'affetto che mi ha sempre offerto e le chiacchiere (il gossip by Bonoli non finirà mai); Gus per tutte le volte che mi sono appoggiato; Daniela per la sua risata; Roberta per *Harry Potter* (come facevo senza??) ma specialmente per l'appoggio e le mille chiacchiere; Letizia per i mille caffè fatti a sbafo nel suo ufficio e per l'aiuto.

Vorrei ringraziare anche tutto lo staff del Dipartimento di Scienze degli Alimenti, il Prof. Franchini e il Dr. Manfreda ma anche il Dr. Lucchi e la Dr.ssa Pasquali, grazie ai quali è risultato possibile condurre questa indagine; in modo particolare devo ringraziare Alex (Dr. Lucchi) per la compagnia, le risate e la sua incredibile tranquillità.

Vorrei porre un particolare ringraziamento a Domenica che mi ha insegnato cosa significa credere e a Rita e Pietro, per l'incredibile aiuto e la compagnia in questi anni.

Per ultimo vorrei ringraziare tutti i miei amici ma specialmente l'unica persona che mi ha dato la forza di uscire da lunghi momenti grigi: Gio ti amo.

BIBLIOGRAFIA

Abdelbaqi K., Ménard A., Prouzet-Mauleon V., Bringaud F., Lehours P., Mégraud F. (2007). Nucleotide sequence of the *gyrA* gene of *Arcobacter* species and characterization of human ciprofloxacin-resistant clinical isolates. *FEMS Immunol Med Microbiol.* **3**: 337-345.

Apostolov E., Al-Soud W., Nilsson I., Kornilovska I., Usenko V., Lyzogubov V., Gaydar Y., Wadstrom T., Ljungh, A. (2005). *Helicobacter pylori* and other *Helicobacter* species in gallbladder and liver of patients with chronic cholecystitis detected by immunological and molecular methods. *Scand. J. Gastroenterol.* **40**: 96-102.

Aspinall S.T., Wareing D.R., Hayward P.G., Hutchinson D.N. (1993). Selective medium for thermophilic campylobacters including *Campylobacter upsaliensis*. *J. Clin. Pathol.* **46**: 829-831.

Atabay H.I., Corry J.E.L., On S.L.W. (1998). Identification of unusual *Campylobacter*-like isolates from poultry products as *Helicobacter pullorum*. *J. Appl. Microbiol.* **84**: 1017-1024.

Atabay, H.I. e Corry, J.E. (1997). The prevalence of campylobacters and arcobacters in broiler chickens. *J. Appl. Microbiol.* **83**: 619-626.

Baele M., Decostere A., Vandamme P., Van den Bulck K., Gruntar I., Mehle J., Mast J., Ducatelle R., Haesebrouck F. (2008). *Helicobacter baculiformis* sp. nov., isolated from feline stomach mucosa. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **58**: 357-364.

Blaser, M.J., Berkowitz I.V., LaForce F.M., Cravens J., Reller L.B., Wang. W.L.L. (1979). *Campylobacter* enteritis: clinical and epidemiologic features. *Ann. Intern. Med.* **91**: 179-185.

Bohr U.R., Primus A., Zagoura A., Glasbrenner B., Wex T., Malfertheiner P. (2002). A group-specific PCR assay for the detection of *Helicobacteraceae* in human gut. *Helicobacter.* **7**: 378-383.

Bolton F.J., Hutchinson D.N., Coates D. (1984). Blood-free selective medium for isolation of *Campylobacter jejuni* from feces. *J. Clin. Microbiol.* **19**: 169-171.

Bolton, F.J., Wareing, D.R.A., Skirrow, M.B., Hutchinson, D.N. (1992). Identification and biotyping of campylobacters. In: Board, R.G., Jones, D., Skinner, F.A. (Eds). *Identification Methods in Applied and Environmental Microbiology*. Blackwell Scientific Publications, Oxford. Pp. 151-161.

Bronsdon M.A., Goodwin C.S., Sly L.I., Chilvers T., Schoenknecht F.D. (1991). *Helicobacter nemestrinae* sp. nov., a spiral bacterium found in the stomach of a pigtailed macaque (*Macaca nemestrina*). *Int. J. Syst. Bacteriol.* **41**(1): 148-153.

Burman W.J., Cohn D.L., Reves R.R., Wilson M.L. (1995). Multifocal cellulitis and monoarticular arthritis as manifestations of *Helicobacter cinaedi* bacteremia. *Clin. Infect. Dis.* **20**: 564-570.

Burnens A. P., Stanley J., Nicolet J. (1996). Possible association of *Helicobacter pullorum* with lesions of vibronic hepatitis in poultry. In: *Campylobacters, Helicobacters and related organisms*, Newell D.G., Ketley J.M. and Feldman R.A. (ed.), New York: Plenum Press. 291-293.

Burnens A.P., Stanley J., Morgenstern R., Nicolet J. (1994). Gastroenteritis associated with *Helicobacter pullorum*. *Lancet* **344**: 1569-1570.

Burnens A.P., Stanley J., Schaad U.B., Nicolet J. (1993). Novel *Campylobacter* – like organism resembling *Helicobacter fennelliae* isolated from a boy with gastroenteritis and from dogs. *J. Clin. Microbiol.* **31**: 1916-1917.

Cahill R.J., Foltz C.J., Fox J.G., Dangler C.A., Powrie F., Schauer D.B. (1997). Inflammatory bowel disease: an immunity-mediated condition triggered by bacterial infection with *Helicobacter hepaticus*. *Infect. Immun.* **65**: 3126-3131.

Cattoir V., Nectoux J., Lascols C., Deforges L., Delchier J.C., Megraud F., Soussy C.J., Cambau E. (2007). Update on fluoroquinolone resistance in *Helicobacter pylori*: new mutations leading to resistance and first description of a *gyrA*

polymorphism associated with hypersusceptibility. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **29**: 389-396.

Ceelen L., Decostere A., Devriese L.A., Ducatelle R., Haesebrouck F. (2005b). *In vitro* susceptibility of *Helicobacter pullorum* strains to different antimicrobial agents. *Microb. Drug. Resist.* **11**: 122-126.

Ceelen L., Decostere A., Martel A., Pasmans F., Haesebrouck F. (2006b). First report of *Helicobacter pullorum* in the faeces of a diarrhoeic psittacine bird (*Psephotus haematogaster*). *Vet. Rec.* **159**: 389-390.

Ceelen L., Decostere A., Verschraegen G., Ducatelle R., Haesebrouck F. (2005a). Prevalence of *Helicobacter pullorum* among patients with gastrointestinal disease and clinically healthy persons. *J. Clin. Microbiol.* **43**: 2984-2986.

Ceelen L.M., Decostere A., Chiers K., Ducatelle R., Maes D., Haesebrouck F. (2007). Pathogenesis of *Helicobacter pullorum* infections in broilers. *Int. J. Food Microbiol.* **116**: 207-213.

Ceelen L.M., Decostere A., Van den Bulck K., On S.L., Baele M., Ducatelle R., Haesebrouck F. (2006c). *Helicobacter pullorum* in chickens, Belgium. *Emerg. Infect. Dis.* **12**: 263-267.

Ceelen L.M., Haesebrouck F., Favoreel H., Ducatelle R., Decostere A. (2006a). The cytolethal distending toxin among *Helicobacter pullorum* strains from human and poultry origin. *Vet. Microbiol.* **113**: 45-53.

Chen, F.J. e Lo, H.J. (2002). Molecular mechanisms of fluoroquinolone resistance. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* **36**: 1-9.

Chevalier C., Thiberge J.M., Ferrero R.L., Labigne A. (1999). Essential role of *Helicobacter pylori* gamma-glutamyltranspeptidase for the colonization of the gastric mucosa of mice. *Mol. Microbiol.* **31**: 1359-1372.

Chin E.Y., Dangler C.A., Fox J.G., Schauer D.B. (2000). *Helicobacter hepaticus* infection triggers inflammatory bowel disease in T cell receptor alphabeta mutant mice. *Comp. Med.* **50**: 586-594.

Collignon P. (2005). Fluoroquinolone use in food animals. *Emerg. Infect. Dis.* **11**: 1789–1790.

Cook G.T. (1950). A Plate Test for Nitrate Reduction. *J. Clin. Pathol.* **3**: 359-362.

Corry J.E e Atabay H.I. (1997). Comparison of the productivity of cefoperazone amphotericin teicoplanin (CAT) agar and modified charcoal cefoperazone

deoxycholate (mCCD) agar for various strains of *Campylobacter*, *Arcobacter* and *Helicobacter pullorum*. *Int. J. Food Microbiol.* **38**: 201-209.

Corry J.E.L., Post D.E., Colin P., Laisney M.J. (1995). Culture media for the isolation of campylobacters. *Int. J. Food Microbiol.* **26**: 43-76.

Costas M. (1992). Classification, identification, and typing of bacteria by the analysis of their one-dimensional polyacrylamide gel electrophoretic protein patterns. In: Chambrach, A., Dunn, M.J., Rodola, B.J. (Eds.). *Advances in Electrophoresis*, Vol. 5. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim. pp. 351–408.

De Groote D., van Doorn L.J., Ducatelle R., Verschuuren A., Haesebrouck F., Quint W.G., Jalava K., Vandamme P. (1999a). 'Candidatus *Helicobacter suis*', a gastric helicobacter from pigs, and its phylogenetic relatedness to other gastrospirilla. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **49**: 1769-1777.

De Groote D., van Doorn L.J., Ducatelle R., Verschuuren A., Tilmant K., Quint W.G., Haesebrouck F., Vandamme P. (1999b). Phylogenetic characterization of 'Candidatus *Helicobacter bovis*', a new gastric helicobacter in cattle. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **49**: 1707-1715.

Dewhirst F.E., Seymour C., Fraser G.J., Paster B.J., Fox J.G. (1994). Phylogeny of *Helicobacter* isolates from bird and swine feces and description of *Helicobacter pametensis* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **44**: 553-60.

Dewhirst F.E., Shen Z., Scimeca M.S., Stokes L.N., Boumenna T., Chen T., Paster B.J., Fox J.G. (2005). Discordant 16S and 23S rRNA gene phylogenies for the genus *Helicobacter*: implications for phylogenetic inference and systematics. *J. Bacteriol.* **187**: 6106-6118.

Drlica K e Zhao X. (1997). DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**: 377-392.

Eaton K.A., Dewhirst F.E., Radin M.J., Fox J.G., Paster B.J., Krakowka S., Morgan D.R. (1993). *Helicobacter acinonyx* sp. nov., isolated from cheetahs with gastritis. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **43**: 99-106.

Foley J.E., Marks S.L., Munson L., Melli A., Dewhirst F.E., Yu S., Shen Z., Fox J.G. (1999). Isolation of *Helicobacter canis* from a colony of bengal cats with endemic diarrhea. *J. Clin. Microbiol.* **37**: 3271-3275.

Fox J.G., Cabot E.B., Taylor N.S., Laraway R. (1988). Gastric colonization by *Campylobacter pylori* subsp. *mustelae* in ferrets. *Infect. Immun.* **56**: 2994-2996.

Fox J.G., Chien C.C., Dewhirst F.E., Paster B.J., Shen Z., Melito P.L., Woodward D.L., Rodgers F.G. (2000). *Helicobacter canadensis* sp. nov. isolated from humans with diarrhea as an example of an emerging pathogen. *J. Clin. Microbiol.* **38**: 2546-2549.

Fox J.G., Dewhirst F.E., Shen Z., Feng Y., Taylor N.S., Paster B.J., Ericson R.L., Lau C.N., Correa P., Araya J.C., Roa I. (1998). Hepatic *Helicobacter* species identified in bile and gallbladder tissue from Chileans with chronic cholecystitis. *Gastroenterology* **114**: 755-763.

Fox J.G., Dewhirst F.E., Tully J.G., Paster B.J., Yan L., Taylor N.S., Collins M.J., Gorelick P.L., Ward J.M. (1994). *Helicobacter hepaticus* sp. nov., a microaerophilic bacterium isolated from livers and intestinal mucosal scrapings from mice. *J. Clin. Microbiol.* **32**: 1238-1245.

Fox J.G., Drolet R., Higgins R., Messier S., Yan L., Coleman B.E., Paster B.J., Dewhirst F.E. (1996). *Helicobacter canis* isolated from a dog liver with multifocal necrotizing hepatitis. *J. Clin. Microbiol.* **34**: 2479-2482.

Fox J.G., Shen Z., Xu S., Feng Y., Dangler C.A., Dewhirst F.E., Paster B.J., Cullen J.M. (2002). *Helicobacter marmotae* sp. nov. isolated from livers of woodchucks and intestines of cats. *J. Clin. Microbiol.* **40**: 2513-2519.

Fox J.G., Taylor N.S., Howe S., Tidd M., Xu S., Paster B.J., Dewhirst F.E. (2006). *Helicobacter anseris* sp. nov. and *Helicobacter brantae* sp. nov., isolated from feces of resident Canada geese in the greater Boston area. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 4633-4637.

Fox J.G., Yan L.L., Dewhirst F.E., Paster B.J., Shames B., Murphy J.C., Hayward A., Belcher J.C., Mendes E.N. (1995). *Helicobacter bilis* sp. nov., a novel *Helicobacter* species isolated from bile, livers, and intestines of aged, inbred mice. *J. Clin. Microbiol.* **33**: 445-454.

Franklin C.L., Beckwith C.S., Livingston R.S., Riley L.K., Gibson S.V., Besch-Williford C.L., Hook R.R. (1996). Isolation of a novel *Helicobacter* species, *Helicobacter cholecystus* sp. nov., from the gallbladders of Syrian hamsters with cholangiofibrosis and centrilobular pancreatitis. *J. Clin. Microbiol.* **34**: 2952-2958.

Franklin C.L., Gorelick P.L., Riley L.K., Dewhirst F.E., Livingston R.S., Ward J.M., Beckwith C.S., Fox J.G. (2001). *Helicobacter typhlonius* sp. nov., a Novel Murine Urease-Negative *Helicobacter* Species. *J. Clin. Microbiol.* **39**: 3920-3926.

Franklin C.L., Riley L.K., Livingston R.S., Beckwith C.S., Besch-Williford C.L., Hook R.R. (1998). Enterohepatic lesions in SCID mice infected with *Helicobacter bilis*. *Lab. Anim. Sci.* **48**: 334-339.

Ge Z., White D.A., Whary M.T., Fox J.G. (2001). Fluorogenic PCR-based quantitative detection of a murine pathogen, *Helicobacter hepaticus*. *J. Clin. Microbiol.* **39**: 2598-2602.

Gibson J.R., Ferrus M.A., Woodward D., Xerry J., Owen R.J. (1999). Genetic diversity in *Helicobacter pullorum* from human and poultry sources identified by an amplified fragment length polymorphism technique and pulsed-field gel electrophoresis. *J. Appl. Microbiol.* **87**: 602-610.

Goodwin C.S., McConnell W., McCulloch R.K., McCullough C., Hill R., Bronsdon M.A., Kasper G. (1989). Cellular fatty acid composition of *Campylobacter pylori* from primates and ferrets compared with those of other campylobacters. *J. Clin. Microbiol.* **27**: 938-943.

Griggs D.J., Hall M.C., Jin Y.F., Piddock L.J. (1994). Quinolone resistance in veterinary isolates of *Salmonella*. *J. Antimicrob. Chemother.* **33**: 1173-1189.

Gueneau P., Loiseaux-De Goër S. (2002). *Helicobacter*: molecular phylogeny and the origin of gastric colonization in the genus. *Infect. Genet. Evol.* **1**: 215-23.

Gundogdu O., Bentley S.D., Holden M.T., Parkhill J., Dorrell N., Wren B.W. (2007). Re-annotation and re-analysis of the *Campylobacter jejuni* NCTC 11168 genome sequence. *BMC Genomics.* **8**: 162

Haines D.C., Gorelick P.L., Battles J.K., Pike K.M., Anderson R.J., Fox J.G., Taylor N.S., Shen Z., Dewhirst F.E., Anver M.R., Ward J.M. (1998). Inflammatory large bowel disease in immunodeficient rats naturally and experimentally infected with *Helicobacter bilis*. *Vet. Pathol.* **35**: 202-208.

Hänninen M.L., Happonen I., Saari S., Jalava K. (1996). Culture and characteristics of *Helicobacter bizzozeronii*, a new canine gastric *Helicobacter* sp. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **46**: 160-166. Erratum in: *Int. J. Syst. Bacteriol.* (1996). **46**: 839.

Hänninen M.L., Kärenlampi R.I., Koort J.M., Mikkonen T., Björkroth K.J. (2005). Extension of the species *Helicobacter bilis* to include the reference strains of *Helicobacter* sp. flexispira taxa 2, 3 and 8 and Finnish canine and feline flexispira strains. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **55**: 891-898.

Hänninen M.L., Utriainen M., Happonen I., Dewhirst F.E. (2003). *Helicobacter* sp. flexispira 16S rDNA taxa 1, 4 and 5 and Finnish porcine *Helicobacter* isolates are members of the species *Helicobacter trogontum* (taxon 6). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53**: 425-433.

Hannula M. e Hänninen M.L. (2007). Phylogenetic analysis of *Helicobacter* species based on partial *gyrB* gene sequences. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **57**: 444-9.

Harper C.G., Feng Y., Xu S., Taylor N.S., Kinsel M., Dewhirst F.E., Paster B.J., Greenwell M., Levine G., Rogers A., Fox J.G. (2002). *Helicobacter cetorum* sp. nov., a urease-positive *Helicobacter* species isolated from dolphins and whales. *J. Clin. Microbiol.* **40**: 4536-4543.

Harvey S.M. (1980). Hippurate hydrolysis by *Campylobacter fetus*. *J. Clin. Microbiol.* **11**: 435-437.

Hynes S.O., Ferris J.A., Szponar B., Wadström T., Fox J.G., O'Rourke J., Larsson L., Yaquian E., Ljungh A., Clyne M., Andersen L.P., Moran A.P. (2004). Comparative chemical and biological characterization of the lipopolysaccharides of gastric and enterohepatic helicobacters. *Helicobacter.* **9**: 313-323.

Itoh T., Yanagawa Y., Shingaki M., Takahashi M., Kai A., Ohashi M., Hamana G. (1987). Isolation of *Campylobacter pyloridis* from human gastric mucosa and characterization of the isolates. *Microbiol. Immunol.* **31**: 603-614.

Jalava K., Kaartinen M., Utriainen M., Happonen I., Hänninen M.L. (1997). *Helicobacter salomonis* sp. nov., a canine gastric *Helicobacter* sp. related to *Helicobacter felis* and *Helicobacter bizzozeronii*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**: 975-982.

Jalava K., On S.L., Vandamme P.A., Happonen I., Sukura A., Hänninen M.L. (1998). Isolation and identification of *Helicobacter* spp. from canine and feline

gastric mucosa. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 3998-4006. Erratum in: *Appl. Environ. Microbiol.* (1999). **65**: 877.

Johnson W.M. e Lior H. (1987). Response of Chinese ovary hamster cells to a cytolethal distending toxin (CDT) of *Escherichia coli* and possible misinterpretation as heat-labile (LT) enterotoxin. *FEMS Microbiol. Lett.* **43**: 19-23.

Kobayashi T., Harada K., Miwa K., Nakanuma Y. (2005). *Helicobacter* genus DNA fragments are commonly detectable in bile from patients with extrahepatic biliary diseases and associated with their pathogenesis. *Dig. Dis. Sci.* **50**: 862-867

Kuijper E.J., Stevens S., Imamura T., De Wever B., Claas E.C. (2003). Genotypic identification of erythromycin-resistant *Campylobacter* isolates as *Helicobacter* species and analysis of resistance mechanism. *J. Clin. Microbiol.* **41**: 3732-3736.

Kullberg M.C., Ward J.M., Gorelick P.L., Caspar P., Hieny S., Cheever A., Jankovic D., Sher A. (1998). *Helicobacter hepaticus* triggers colitis in specific-pathogen-free interleukin-10 (IL-10)-deficient mice through an IL-12- and gamma interferon-dependent mechanism. *Infect. Immun* **66**: 5157-5166.

Lee A, Phillips MW, O'Rourke JL, Paster BJ, Dewhirst FE, Fraser GJ, Fox JG, Sly LI, Romaniuk PJ, Trust TJ, *et al.* (1992). *Helicobacter muridarum* sp. nov., a

microaerophilic helical bacterium with a novel ultrastructure isolated from the intestinal mucosa of rodents. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **42**: 27-36.

Lee M.D. e Newell D.G. (2006). *Campylobacter* in poultry: filling an ecological niche. *Avian. Dis.* **50**: 1-9.

Leemann C., Gambillara E., Prod'hom G., Jaton K., Panizzon R., Bille J., Francioli P., Greub G., Laffitte E., Tarr P.E. (2006). Bacteremia and Multifocal Cellulitis due to *Helicobacter canis*: First Case in an Immunocompetent Patient. *J. Clin. Microbiol.* **44**: 4598-4600.

Linton D., Owen R.J., Stanley J. (1996). Rapid identification by PCR of the genus *Campylobacter* and of five *Campylobacter* species enteropathogenic for man and animals. *Res. Microbiol.* **147**: 707-718.

Ljungh A. e Wadstrom T. (2002). The role of microorganisms in biliary tract disease. *Curr. Gastroenterol. Rep.* **4**: 167-171.

Luber P., Wagner J., Hahn H., Bartelt E. (2003). Antimicrobial resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* strains isolated in 1992 and 2001-2002 from poultry and humans in Berlin, Germany. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**: 3825-3830.

Marshall B.J., McGeachie D.B., Rogers P.A., Glancy R.J. (1985). Pyloric *Campylobacter* infection and gastroduodenal disease. *Med. J. Aust.* **142**: 439-444.

Matsukura N., Yokomuro S., Yamada S., Tajiri T., Sundo T., Hadama T., Kamiya S., Naito Z., Fox J.G. (2002). Association between *Helicobacter bilis* in bile and biliary tract malignancies: *H. bilis* in bile from Japanese and Thai patients with benign and malignant diseases in the biliary tract. *Jpn. J. Cancer Res.* **93**: 842-847.

Maurer K.J., Ihrig M.M., Rogers A.B., Bouchard G., Leonard M.R., Carey M.C., Fox J.G. (2005). Identification of cholelithogenic enterohepatic *Helicobacter* species and their role in murine cholesterol gallstone formation. *Gastroenterology* **128**: 1023-1033.

Melito, P.L., Woodward, D.L., Bernard, K.A., Price, L., Khakhria, R., Johnson, W.M., Rodgers, F.G., (2000). Differentiation of clinical *Helicobacter pullorum* isolates from related *Helicobacter* and *Campylobacter* species. *Helicobacter* **5**: 142-147.

Mendes E.N., Queiroz D.M., Dewhirst F.E., Paster B.J., Moura S.B., Fox J.G. (1996). *Helicobacter trogontum* sp. nov., isolated from the rat intestine. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **46**: 916-921.

Mikkonen, T.P., Karenlampi, R.I., Hänninen, M.L. (2004). Phylogenetic analysis of gastric and enterohepatic *Helicobacter* species based on partial HSP60 gene sequences. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**: 53-58.

Miller W.G., Craig T. P., Rubenfield M., Mendz G. L., Wösten M.M.S.M., Ussery D.W., Stolz J.F., Binnewies T.T., Hallin P.F., Wang G., Malek J.A., Rogosin A., Stanker L.H., Mandrell R. E. (2007). The Complete Genome Sequence and Analysis of the Epsilonproteobacterium *Arcobacter butzleri*. *PLoS ONE.* **2**: e1358

Mills C.K. e Gherna R.L.. (1987). Hydrolysis of indoxyl acetate by *Campylobacter* species. *J. Clin. Microbiol.* **25**: 1560-1561.

Moniot-Ville N., Guibert J., Moreau N., Acar J.F., Collatz E., Gutmann L. (1991). Mechanisms of quinolone resistance in a clinical isolate of *Escherichia coli* highly resistant to fluoroquinolones but susceptible to nalidixic acid. *Antimicrob. Agents Chemother.* **35**: 519-523.

Moore J.E., Barton M.D., Blair I.S., Corcoran D., Dooley J.S., Fanning S., Kempf I., Lastovica A.J., Lowery C.J., Matsuda M., McDowell D.A., McMahon A., Millar B.C., Rao J.R., Rooney P.J., Seal B.S., Snelling W.J., Tolba O. (2006). The epidemiology of antibiotic resistance in *Campylobacter*. *Microbes Infect.* **8**: 1955-1966.

Moore R.A., Beckthold B., Wong S., Kureishi A., Bryan L.E. (1995). Nucleotide sequence of the *gyrA* gene and characterization of ciprofloxacin-resistant mutants of *Helicobacter pylori*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**: 107-111.

Mouneimné H., Robert J., Jarlier V., Cambau E. (1999). Type II topoisomerase mutations in ciprofloxacin-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**: 62-66.

Moyaert H., Decostere A., Vandamme P., Debruyne L., Mast J., Baele M., Ceelen L., Ducatelle R., Haesebrouck F. (2007). *Helicobacter equorum* sp. nov., a urease-negative *Helicobacter* species isolated from horse faeces. *Int J Syst Evol Microbiol.* **57**: 213-218.

Murata H., Tsuji. S., Tsujii M., Fu H.Y., Tanimura H., Tsujimoto M., Ma N., Kawano S., Hori M. (2004). *Helicobacter bilis* infection in biliary tract cancer. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **20 Suppl 1**: 90-94.

National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), 2002. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals, Second edition: Approved Standard M31-A2, NCCLS, Wayne, PA pp. 80.

National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), 2004. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Fourteenth Informational Supplement: Approved Standard M100-S14, NCCLS, Wayne, PA pp. 156.

Nebbia P., Tramuta C., Ortoffi M., Bert E., Cerruti Sola S., Robino P. (2007). Identification of enteric *Helicobacter* in avian species. *Schweiz. Arch. Tierheilkd.* **149**: 403-407.

Neubauer C. e Hess M. (2006). Tissue tropism of *Helicobacter pullorum* in specific pathogen-free chickens determined by culture and nucleic acid detection. *Avian. Dis.* **50**: 620-3.

Nilsson H. O., Stenram U., Ihse I., Wadström T. (2006). *Helicobacter* species ribosomal DNA in the pancreas, stomach and duodenum of pancreatic cancer patients. *World J. Gastroenterol.* **12**: 3038-3043.

Okuda J., Hayakawa E., Nishibuchi M., Nishino T. (1999). Sequence analysis of the *gyrA* and *parC* homologues of a wild-type strain of *Vibrio parahaemolyticus* and its fluoroquinolone-resistant mutants. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**: 1156-1162.

On, S.L., Holmes, B., (1991a). Reproducibility of tolerance tests that are useful in the identification of campylobacteria. *J. Clin. Microbiol.* **29**: 1785-1788.

On, S.L., Holmes, B., (1991b). Effect of inoculum size on the phenotypic characterization of *Campylobacter* species. *J. Clin. Microbiol.* **29**: 923-926.

On, S.L., Holmes, B., (1992). Assessment of enzyme detection tests useful in identification of campylobacteria. *J. Clin. Microbiol.* **30**: 746-749.

On, S.L., Holmes, B., Sackin, M.J., (1996). A probability matrix for the identification of campylobacters, helicobacters and allied taxa. *J. Appl. Bacteriol.* **81**: 425-432.

On, S.L., Lee, A., O'Rourke, J.L., Dewhirst, F.E., Patster, B.J., Fox, J.G. and Vandamme, P., (2005). Genus I. *Helicobacter*. In: Brenner, D.J., Krieg, N.R., Staley, J.T., Garrity G.M. (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, **Vol.2, Part C**. Springer Science and Business Media, Inc, 233, New York, USA. 1169–1189.

Orlicek S.L., Welch D.F., Kuhls T.L. (1993). Septicemia and meningitis caused by *Helicobacter cinaedi* in a neonate. *J. Clin. Microbiol.* **31**: 569-571

Owen R.J., Martin S.R., Borman P. (1985). Rapid urea hydrolysis by gastric *Campylobacters*. *Lancet.* **1**: 111.

Oyarzabal O.A., Rad R., Backert S. (2007). Conjugative transfer of chromosomally encoded antibiotic resistance from *Helicobacter pylori* to *Campylobacter jejuni*. *J. Clin. Microbiol.* **45**: 402-408.

Paster B.J., Lee A., Fox J.G., Dewhirst F.E., Tordoff L.A., Fraser G.J., O'Rourke J.L., Taylor N.S., Ferrero R. (1991). Phylogeny of *Helicobacter felis* sp. nov., *Helicobacter mustelae*, and related bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **41**: 1-8.

Patterson M.M., Schrenzel M.D., Feng Y., Xu S., Dewhirst F.E., Paster B.J., Thibodeau S.A., Versalovic J., Fox J.G. (2000). *Helicobacter aurati* sp. nov., a urease-positive *Helicobacter* species cultured from gastrointestinal tissues of Syrian hamsters. *J. Clin. Microbiol.* **38**: 3722-3728.

Pellicano R., Mazzaferro V., Grigioni W.F., Cutufia M.A., Fagoonee S., Silengo L., Rizzetto M., Ponzetto A. (2004). *Helicobacter* species sequences in liver samples from patients with and without hepatocellular carcinoma. *World J. Gastroenterol.* **10**: 598-601.

Piddock L.J., Griggs D.J., Hall M.C., Jin Y.F. (1993). Ciprofloxacin resistance in clinical isolates of *Salmonella typhimurium* obtained from two patients. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**: 662-666.

Piddock L.J., Jin Y.F., Webber M.A., Everett M.J. (2002). Novel ciprofloxacin-resistant, nalidixic acid-susceptible mutant of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**: 2276-2278.

Piddock L.J., Ricci V., Pumbwe L., Everett M.J., Griggs D.J. (2003). Fluoroquinolone resistance in *Campylobacter* species from man and animals: detection of mutations in topoisomerase genes. *J. Antimicrob. Chemother.* **51**: 19-26.

Pilon C., Prouzel-Mauléon V., Ménard A., Mégraud F. (2005). Development of a real-time quantitative PCR specific to *Helicobacter pullorum*. In: Thirteenth International Workshop on *Campylobacter*, *Helicobacter* and Related Organisms (CHRO): Abstracts of Scientific Presentations, September 4-8th. Gold Coast, Queensland, Australia, p. 62

Ponzetto A., Pellicano R., Leone N., Cutufia M.A., Turrini F., Grigioni W.F., D'Errico A., Mortimer P., Rizzetto M., Silengo L. (2000). *Helicobacter* infection and cirrhosis in hepatitis C virus carriage: is it an innocent bystander or a troublemaker? *Med. Hypotheses* **54**: 275-277.

Pot B., Vandamme P., Kersters K. (1994). Analysis of Electrophoretic Whole-Organisms Protein Fingerprints. In: Goodfellow M. e O'Donnell A.G. (ed). Modern microbial methods. Chemical methods in prokaryotic systematics. John Wiley & Sons Ltd., Chichester, England: 493-521.

Prag J., Blom J., Kroghfelt K.A. (2007). *Helicobacter canis* bacteraemia in a 7-month-old child. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **50**: 264-267.

Reller L.B., Merritt S., Reimer L.G. (1983). Controlled evaluation of an improved selective medium for isolation of *Campylobacter jejuni* from human feces. Abstr. 83rd Annu. Meet. Am. Soc. Microbiol. p. 357.

Robertson B.R., O'Rourke J.L., Vandamme P., On S.L., Lee A. (2001). *Helicobacter ganmani* sp. nov., a urease-negative anaerobe isolated from the intestines of laboratory mice. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**: 1881-1889.

Rocha M., Avenaud P., Menard A., Le Bail B., Balabaud C., Bioulac-Sage P., de Magalhaes Queiroz D.M., Megraud F. (2005). Association of *Helicobacter* species with hepatitis C cirrhosis with or without hepatocellular carcinoma. *Gut* **54**: 396-401.

Rossi M., Hänninen M.L., Revez J., Hannula M., Zanoni R.G. (2007). Occurrence and species level diagnostics of *Campylobacter* spp., enteric *Helicobacter* spp. and *Anaerobiospirillum* spp. in healthy and diarrheic dogs and cats. *Vet. Microbiol.* in press

Saunders K.E., McGovern K.J., Fox J.G. (1997). Use of pulsed-field gel electrophoresis to determine genomic diversity in strains of *Helicobacter hepaticus* from geographically distant locations. *J. Clin. Microbiol.* **35**: 2859-2863.

Shen Z., Fox J.G., Dewhirst F.E., Paster B.J., Foltz C.J., Yan L., Shames B., Perry L. (1997). *Helicobacter rodentium* sp. nov., a urease-negative *Helicobacter* species isolated from laboratory mice. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**: 627-634.

Shine J. e Dalgarno L. (1974). Identical 3'-terminal octanucleotide sequence in 18S ribosomal ribonucleic acid from different eukaryotes. A proposed role for this sequence in the recognition of terminator codons. *Biochem. J.* **141**: 609-615.

Simmons J.H., Riley L.K., Besch-Williford C.L., Franklin C.L. (2000). *Helicobacter mesocricetorum* sp. nov., a novel *Helicobacter* isolated from the feces of Syrian hamsters. *J. Clin. Microbiol.* **38**: 1811-1817.

Simons E., Spacek L.A., Lederman H.M., Winkelstein J.A. (2004). *Helicobacter cinaedi* bacteremia presenting as macules in an afebrile patient with X-linked agammaglobulinemia. *Infection.* **32**: 367-368.

Skirrow, M.B. (1977). *Campylobacter* enteritis: a new disease. *Br. Med. J.* **2**: 9-11.

Solnick J.V. e Schauer D.B. (2001). Emergence of diverse *Helicobacter* species in the pathogenesis of gastric and enterohepatic diseases. *Clin. Microbiol. Rev.* **14**: 59-97.

Stanley J., Linton D., Burnens A.P., Dewhirst F.E., On S.L., Porter A., Owen R.J., Costas M. (1994). *Helicobacter pullorum* sp. nov.-genotype and phenotype of a new species isolated from poultry and from human patients with gastroenteritis. *Microbiology.* **140**: 3441-3449.

Stanley J., Linton D., Burnens A.P., Dewhirst F.E., Owen R.J., Porter A., On S.L., Costas M. (1993). *Helicobacter canis* sp. nov., a new species from dogs: an integrated study of phenotype and genotype. *J. Gen. Microbiol.* **139**: 2495-2504.

Steele T.W. e McDermott S.N. (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.

Steinbrueckner, B., Haerter G., Pelz K., Weiner S., Rump, J.A., Deissler, W., Bereswill S., Kist, M. (1997). Isolation of *Helicobacter pullorum* from patients with enteritis. *Scand. J. Infect. Dis.* **29**: 315-318.

Suerbaum S. e Josenhans C. (2007). *Helicobacter pylori* evolution and phenotypic diversification in a changing host. *Nat. Rev. Microbiol.* **5**: 441-452

Suerbaum S., Josenhans C., Sterzenbach T., Drescher B., Brandt P., Bell M., Dröge M., Fartmann B., Fischer H.P., Ge Z., Hörster A., Holland R., Klein K., König J., Macko L., Mendz G.L., Nyakatura G., Schauer D.B., Shen Z., Weber J., Frosch M., Fox J.G. (2003). The complete genome sequence of the carcinogenic bacterium *Helicobacter hepaticus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**: 7901-7906.

Suerbaum S., Kraft C., Dewhirst F.E., Fox J.G. (2002). *Helicobacter nemestrinae* ATCC 49396T is a strain of *Helicobacter pylori* (Marshall *et al.* 1985) Goodwin *et al.* 1989, and *Helicobacter nemestrinae* Bronsdon *et al.* 1991 is therefore a junior heterotypic synonym of *Helicobacter pylori*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **52**: 437-439.

Sullivan A.K., Nelson M.R., Walsh J., Gazzard, B.J. (1997). Recurrent *Helicobacter cinaedi* cellulitis and bacteraemia in a patient with HIV Infection. *Int. J. STD AIDS* **8**: 59-60.

Taneera J., Moran A.P., Hynes S.O., Nilsson H.O., Al-Soud W., Wadström T. (2002). Influence of activated charcoal, porcine gastric mucin and beta-cyclodextrin on the morphology and growth of intestinal and gastric *Helicobacter* spp. *Microbiology*. **148**: 677-684.

Tomb J.F., White O., Kerlavage A.R., *et al.* (1997). The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature*. **388**: 539-547.

Totten P.A., Fennell C.L., Tenover F.C., Wezenberg J.M., Perine P.L., Stamm W.E., Holmes K.K. (1985). *Campylobacter cinaedi* (sp. nov.) and *Campylobacter fennelliae* (sp. nov.): two new *Campylobacter* species associated with enteric disease in homosexual men. *J. Infect. Dis.* **151**: 131-139.

Tramuta C., Buttignol S., Bert E., Nebbia P. (2003). Identificazione di *Helicobacter* in specie aviari con metodiche biomolecolari. *Large Animals Review.* **6**: 85-86.

Uckay I., Garbino J., Dietrich P.Y., Ninet B., Rohner P., Jacomo V. (2006). Recurrent bacteremia with *Helicobacter cinaedi*: case report and review of the literature. *BMC Infect. Dis.* **6**: 86.

Ursing J.B., Lior H., Owen R.J. (1994). Proposal of minimal standards for describing new species of the family *Campylobacteraceae*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **44**: 842-845.

Van den Bulck K., Decostere A., Baele M., Marechal M., Ducatelle R., Haesebrouck F. (2006b). Low frequency of *Helicobacter* species in the stomachs of experimental rabbits. *Lab. Anim.* **40**: 282-287.

Van den Bulck K., Decostere A., Baele M., Vandamme P., Mast J., Ducatelle R., Haesebrouck F. (2006a). *Helicobacter cynogastricus* sp. nov., isolated from the canine gastric mucosa. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **56**: 1559-1564.

Vandamme P., Falsen E., Rossau R., Hoste B., Segers P., Tytgat R., De Ley J. (1991). Revision of *Campylobacter*, *Helicobacter*, and *Wolinella* taxonomy: emendation of generic descriptions and proposal of *Arcobacter* gen. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **41**: 88-103.

Vandamme P., Harrington C.S., Jalava K., On S.L. (2000). Misidentifying helicobacters: the *Helicobacter cinaedi* example. *J. Clin. Microbiol.* **38**: 2261-2266.

Vorobjova T., Nilsson I., Terjajev S., Granholm M., Lyyra M., Porkka T., Prükk T., Salupere R., Maaros H.I., Wadström T., Uibo R. (2006). Serum antibodies to enterohepatic *Helicobacter* spp. in patients with chronic liver diseases and in a population with high prevalence of *H. pylori* infection. *Dig. Liver. Dis.* **38**: 171-176.

Wang G., Wilson T.J., Jiang Q., Taylor D.E. (2001). Spontaneous mutations that confer antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**: 727-733.

Wang Y, Huang WM, Taylor DE. (1993). Cloning and nucleotide sequence of the *Campylobacter jejuni gyrA* gene and characterization of quinolone resistance mutations. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**: 457-463.

Ward J.M., Anver M.R., Haines D.C., Melhorn J.M., Gorelick P., Yan L., Fox J.G. (1996). Inflammatory large bowel disease in immunodeficient mice naturally infected with *Helicobacter hepaticus*. *Lab. Anim. Sci.* **46**: 15-20.

Whitehouse C.A., Balbo P.B., Pesci E.C., Cottle D.L., Mirabito P.M., Pickett C.L. (1998). *Campylobacter jejuni* cytolethal distending toxin causes a G2-phase cell cycle block. *Infect Immun.* **66**: 1934-1940.

Won Y.S., Vandamme P., Yoon J.H., Park Y.H., Hyun B.H., Kim H.C., Itoh T., Tanioka Y., Choi Y.K. (2007). *Helicobacter callitrichis* sp. nov., a novel *Helicobacter* species isolated from the feces of the common marmoset (*Callithrix jacchus*). *FEMS Microbiol Lett.* **271**: 239-244.

Yoshida H, Kojima T, Yamagishi J, Nakamura S. (1988). Quinolone-resistant mutations of the *gyrA* gene of *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* **211**: 1-7.

Young V.B., Chien C.C., Knox K.A., Taylor N.S., Schauer D.B., Fox J.G. (2000). Cytolethal distending toxin in avian and human isolates of *Helicobacter pullorum*. *J. Infect. Dis.* **182**: 620-623.

Zhang L., Day A., McKenzie G., Mitchell H. (2006). Nongastric *Helicobacter* species detected in the intestinal tract of children. *J. Clin. Microbiol.* **44**: 2276-2279.