



# Epidemiologia e farmacoresistenza dei ceppi di *Campylobacter* spp. isolati da pazienti dell'Azienda Ospedaliera di Padova

Alberto Reale, Medico in formazione specialistica  
Scuola di Specializzazione in Microbiologia e Virologia  
Dipartimento di Medicina Molecolare  
Università degli Studi di Padova

# *Campylobacter spp*

- Famiglia *Campylobacteriaceae*
- Bastoncini Gram-negativi di morfologia curva
- Microaerofili (5% O<sub>2</sub>) o raramente anaerobi

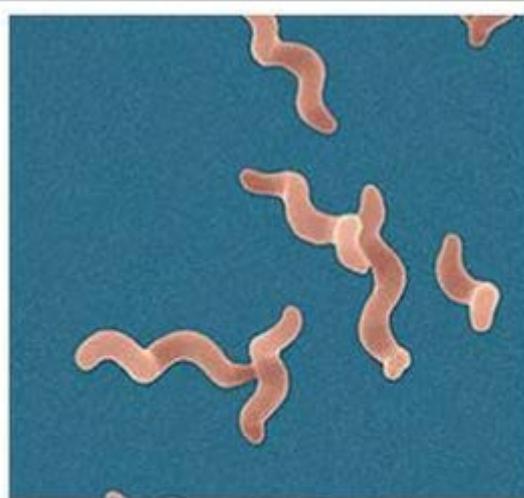


Figure 1: Scanning Electron Microscopy image of *C. Jejuni* during Log Phase at 3,400x magnification (Kunkel (2004))



Figure 2: Phase Microscopy of *C. Jejuni* under a gram stain (Anon, keywordpictures.com (2011))

# Campilobacteriosi umane

- Patologia più frequente: enterite da *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari* o altre specie (*C. conciscus*, *C. upsaliensis*...)
- Malattie invasive, in particolare nel paziente immunocompromesso (sepsi, meningite, miocardite, etc)
- Alcuni *Campylobacter spp* del cavo orale implicati nella parodontite.
- *C. fetus* può essere causa di sepsi.

# *Campylobacter* e patologie autoimmuni

Alcuni ceppi di *Campylobacter* patogeni sono fortemente associati a:

- Sindrome di Guillain-Barré (poliradicolonevrite acuta, mimetismo tra LOS sialilato di alcuni ceppi di *C. jejuni* e gangliosidi presenti nei nervi periferici).
- Artrite reattiva
- Possibile associazione con l'insorgenza di malattie infiammatorie intestinali.

# Epidemiologia

- Patogeni a trasmissione zoonotica (es. pollame, bovini...)
- *Campylobacter spp* (specialmente *C. jejuni* e *C. coli*) sono o stanno diventando la prima causa di enterite batterica di eziologia definita nel mondo occidentale.
- A fronte di un calo delle infezioni da *Salmonella spp* e *Shigella spp* le enteriti da *Campylobacter* sembrano stabili o in aumento in Europa e Nord America.

# Epidemiologia

Figure 1. Reported confirmed campylobacteriosis cases: distribution of by country, EU/EEA, 2014



Source: Country reports from Austria, Belgium, Bulgaria, Cyprus, the Czech Republic, Denmark, Estonia, Finland, France, Germany, Hungary, Iceland, Ireland, Italy, Latvia, Lithuania, Luxembourg, Malta, the Netherlands, Norway, Poland, Romania, Slovakia, Slovenia, Spain, Sweden, United Kingdom.

Suggested citation: European Centre for Disease Prevention and Control. Annual epidemiological report 2015. Campylobacteriosis. Stockholm: ECDC; 2016.

© European Centre for Disease Prevention and Control, 2016. Reproduction is authorised, provided the source is acknowledged

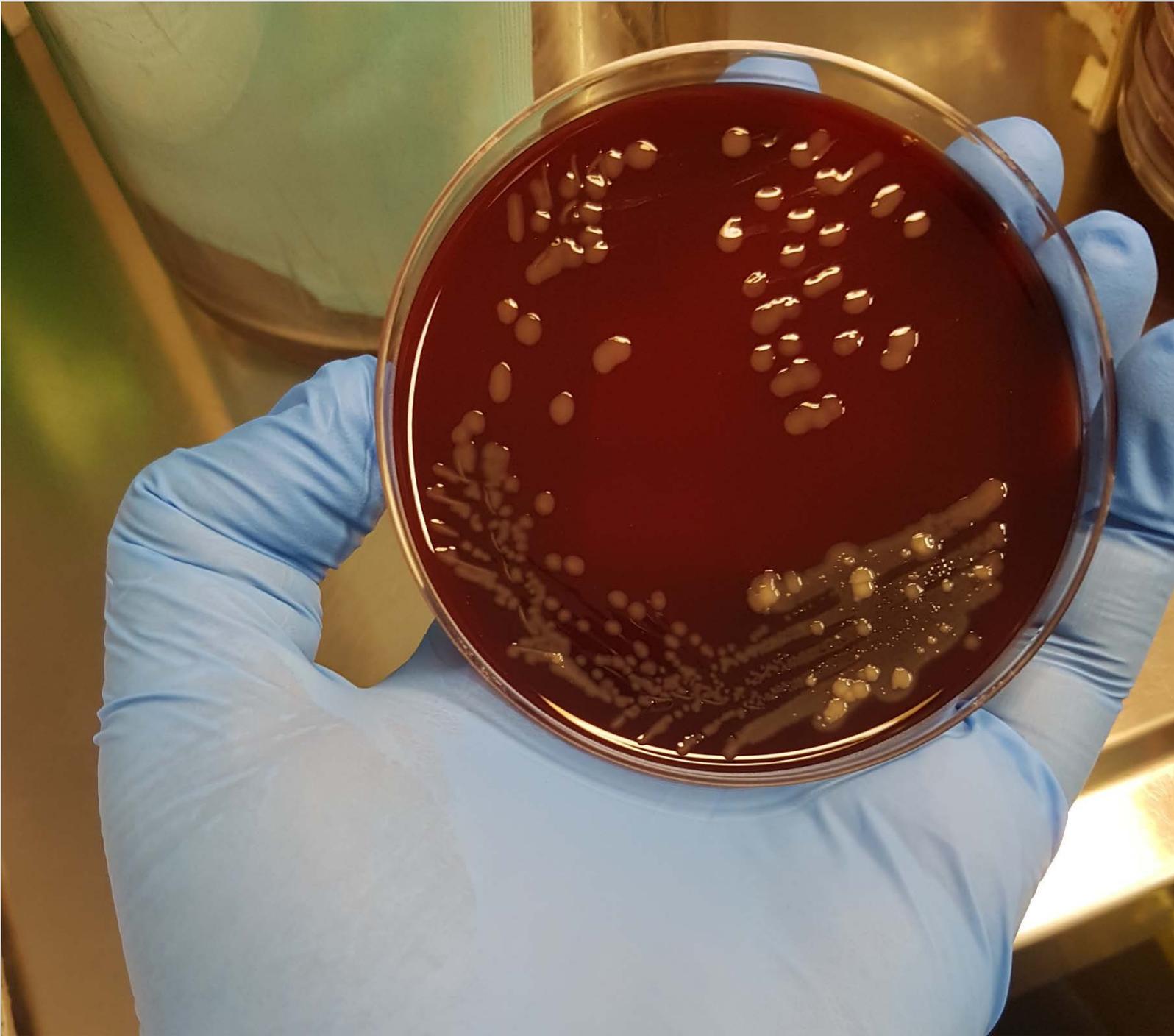
# Epidemiologia delle resistenze

- La resistenza alla ciprofloxacina è bassa in Australia, Nord America, paesi scandinavi.
- In generale più alta in Europa, soprattutto nel Sud Europa.
- Molto elevata nel Sud-Est asiatico (es Thailandia).
- Poco diffusa la resistenza ai macrolidi.
- *C. coli* è associato a maggiore farmacoresistenza di *C. jejuni*.

Diagnosi

# Esame colturale

- Feci in terreno di trasporto (ad es Cary-Blair)
- Isolamento su terreno selettivo (o non selettivo dopo filtrazione)
- Ad es. Campylobacter Blood Agar (Campy-Ba)
- Vancomicina, trimethoprim, polimixina B, amfotericina B, cephalothin.
- Incubazione in microaerofilia (5% O<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub>, 85% N<sub>2</sub>) per 48h
- Temperatura di crescita 42°C



# Identificazione da colonia

- Spettrometria di massa MALDI-TOF
- Test fenotipici (ad es ossidasi, catalasi)
- Test immunologici
- Biologia molecolare

# Identificazione da colonia

- Isolamento in coltura consente di eseguire test fenotipici di suscettibilità agli antibiotici.
- Individuazione di più specie di *Campylobacter*, ad es *C. lari*.
- Sensibilità inferiore ai test di biologia molecolare.
- Alcuni *Campylobacter* spp potenzialmente patogeni richiedono una temperatura di 37°C e/o atmosfera arricchita in H<sub>2</sub> (ad es *C. concisus*)

# Biologia molecolare

- Ricerca diretta di acidi nucleici su feci fresche o in mezzo di trasporto (ad es Real-Time PCR)
- Sensibilità e specificità molto elevate
- Numerose metodiche commerciali, specie per enteropatogeni.
- Nella nostra struttura utilizzo di FILMA (BioMérieux)
- A fronte di un costo relativamente elevato (per campione) di batteri, virus e parassiti
- *C. jejuni*, *C. coli*, *C. upsaliensis*
- No individuazione farmaco-resistenze, sebbene possano essere ricercate in biologia molecolare (a patto di conoscere le mutazioni target).

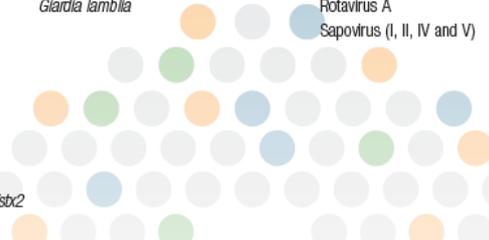
**FilmArray® Gastrointestinal Panel**

**1 Test. 22 Targets. All in about an hour.**

Bacteria	Parasites	Viruses
 <ul style="list-style-type: none"><li><i>Campylobacter (jejuni, coli and upsaliensis)</i></li><li><i>Clostridium difficile</i> (Toxin A/B)</li><li><i>Plesiomonas shigelloides</i></li><li><i>Salmonella</i></li><li><i>Yersinia enterocolitica</i></li><li><i>Vibrio (parahaemolyticus, vulnificus and cholerae)</i></li><li><i>Vibrio cholerae</i></li></ul>	 <ul style="list-style-type: none"><li><i>Cryptosporidium</i></li><li><i>Cyclospora cayentanensis</i></li><li><i>Entamoeba histolytica</i></li><li><i>Giardia lamblia</i></li></ul>	 <ul style="list-style-type: none"><li>Adenovirus F 40/41</li><li>Astrovirus</li><li>Norovirus GI/GII</li><li>Rotavirus A</li><li>Sapovirus (I, II, IV and V)</li></ul>

**Diarrheagenic E. coli/Shigella**

- Enteroc aggregative *E. coli* (EAEC)
- Enteropathogenic *E. coli* (EPEC)
- Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) *ht/st*
- Shiga-like toxin-producing *E. coli* (STEC) *stx1/stx2*
- E. coli* O157
- Shigella*/Enteroinvasive *E. coli* (EIEC)



# Test immunologici

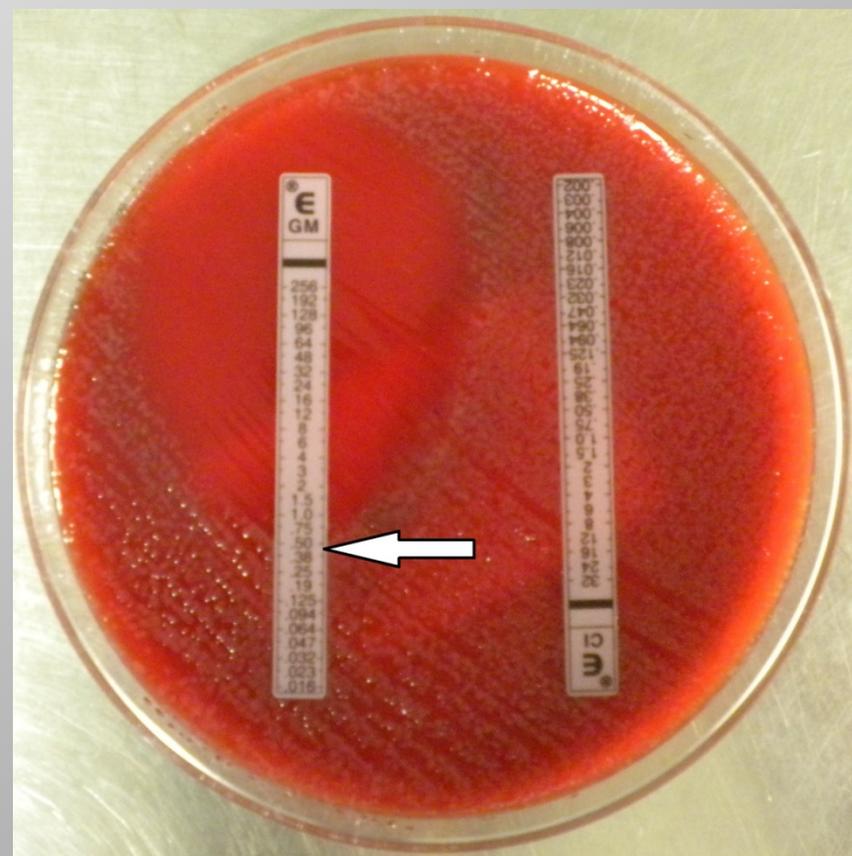
- Ricerca antigene su feci.
- Ricerca anticorpi su siero (valore soprattutto epidemiologico, o di studio dei pazienti con sospette sequele immunomediate)
- IgA, IgG (ELISA)

# Test suscettibilità antimicrobici

# Metodiche

- Microdiluizione in brodo (consente di definire la Minimal Inhibitory Concentration o MIC)
- Disk diffusion su MH agar
- E-test su MH agar (striscia graduata che rilascia concentrazioni diverse del farmaco testato: consente di definire la MIC).

- L'agenzia europea EUCAST fornisce breakpoint interpretativi per ciprofloxacina, eritromicina (predittiva di suscettibilità o resistenza a tutti i macrolidi), tetraciclina (predittiva anche per doxiciclina).
- La Società Francese di Microbiologia fornisce breakpoint anche per gentamicina (usata per trattare le infezioni sistemiche) e amoxiclavulanato.
- La patologia enterica si risolve in circa una settimana in assenza di terapia.
- Una terapia antibiotica appropriata riduce la durata dei sintomi e il rischio di complicanze.
- Indicazione soprattutto in individui immunocompromessi, anziani e pz pediatrici.



# Interpretazione test suscettibilità antimicrobici

*Campylobacter jejuni* and *coli*

EUCAST Clinical Breakpoint Tables v. 7.1, valid from 2017-03-10

Disk diffusion (EUCAST standardized disk diffusion method)  
**Medium:** Mueller-Hinton agar + 5% defibrinated horse blood and 20 mg/L β-NAD (MH-F). The MH-F plates should be dried prior to inoculation to reduce swarming (at 20-25°C overnight or at 35°C, with the lid removed, for 15 min).  
**Inoculum:** McFarland 0.5  
**Incubation:** Microaerobic environment, 41±1°C, 24h. Isolates with insufficient growth after 24h incubation are reincubated immediately and inhibition zones read after a total of 40-48h incubation.  
**Reading:** Read zone edges as the point showing no growth viewed from the front of the plate with the lid removed and with reflected light.  
**Quality control:** *Campylobacter jejuni* ATCC 33560

Fluoroquinolones	MIC breakpoint (mg/L)		Disk content (µg)	Zone diameter breakpoint (mm)		Notes Numbered notes relate to general comments and/or MIC breakpoints. Lettered notes relate to the disk diffusion method.
	S ≤	R >		S ≥	R <	
Ciprofloxacin	0.5	0.5	6	26	26	

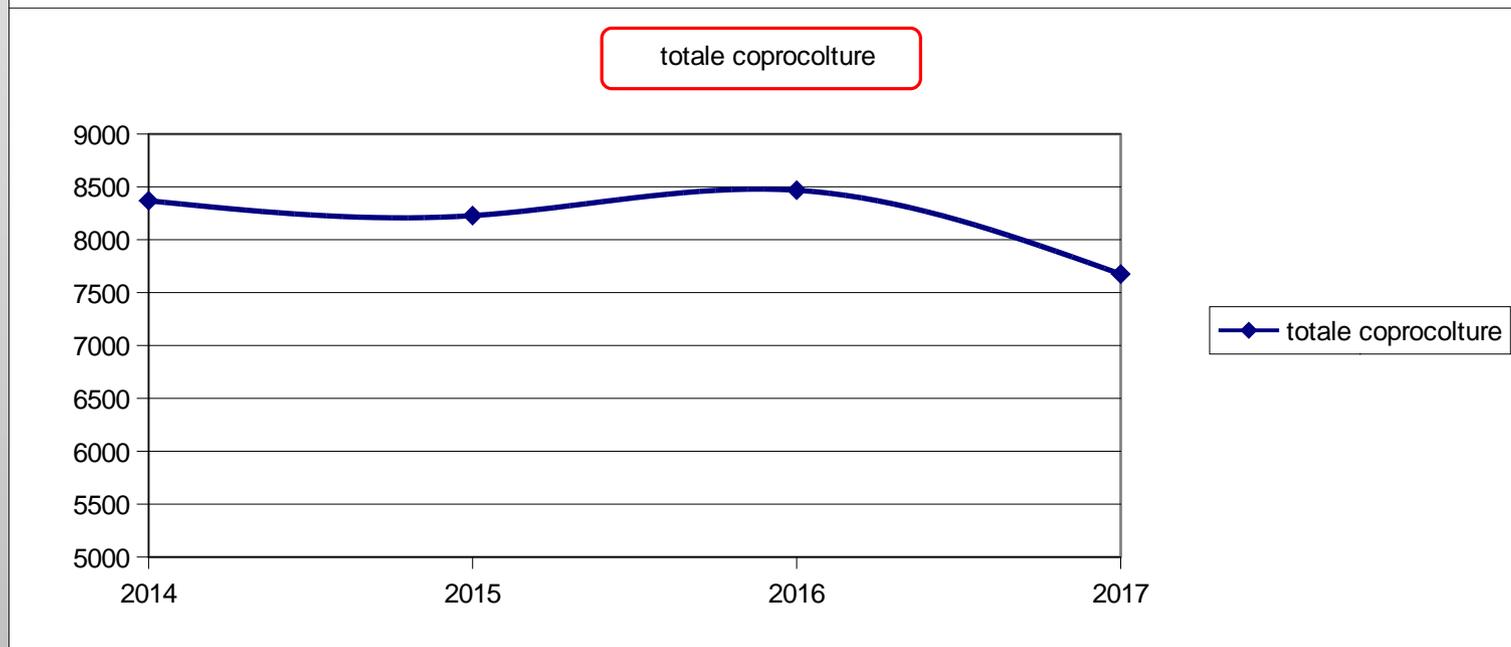
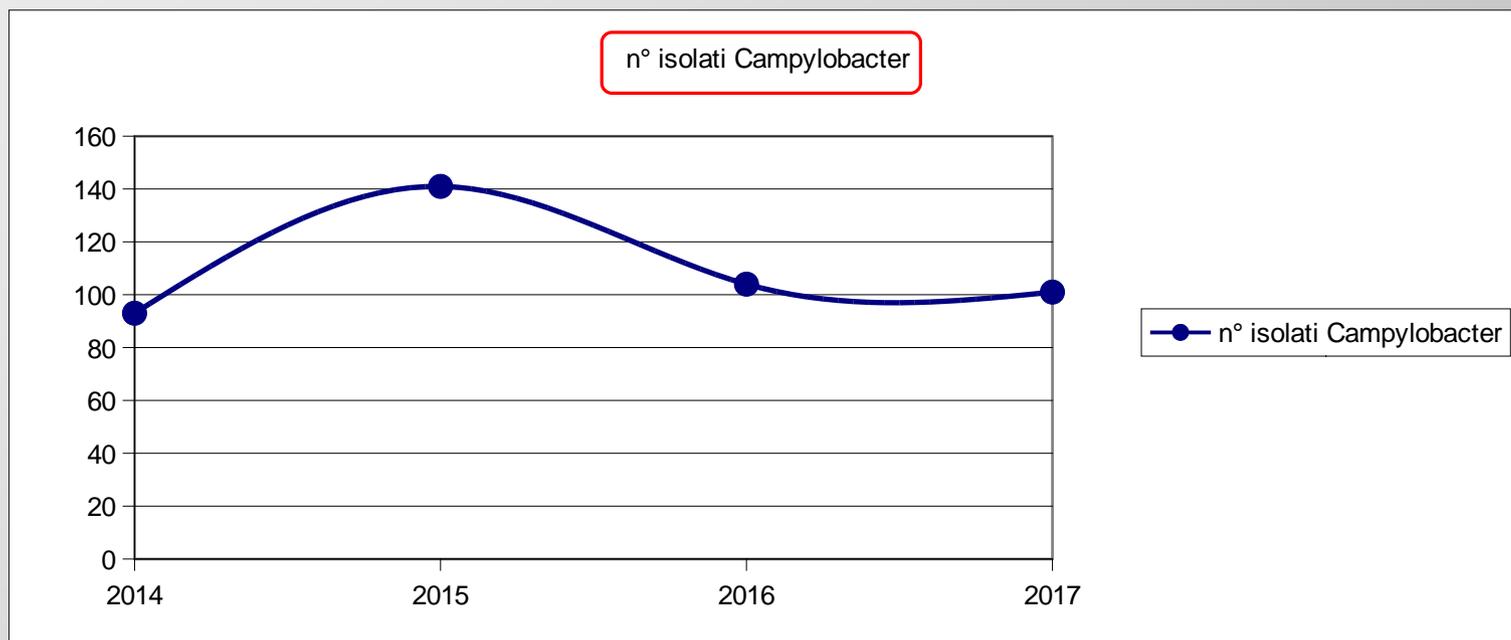
Macrolides	MIC breakpoint (mg/L)		Disk content (µg)	Zone diameter breakpoint (mm)		Notes Numbered notes relate to general comments and/or MIC breakpoints. Lettered notes relate to the disk diffusion method.
	S ≤	R >		S ≥	R <	
Azithromycin	Note <sup>1</sup>	Note <sup>2</sup>		Note <sup>A</sup>	Note <sup>A</sup>	1/A. Erythromycin can be used to determine susceptibility to azithromycin and clarithromycin.
Clarithromycin	Note <sup>1</sup>	Note <sup>2</sup>		Note <sup>A</sup>	Note <sup>A</sup>	
Erythromycin, <i>C. jejuni</i>	4 <sup>1</sup>	4 <sup>1</sup>	16	20 <sup>A</sup>	20 <sup>A</sup>	
Erythromycin, <i>C. coli</i>	8 <sup>1</sup>	8 <sup>1</sup>	16	24 <sup>A</sup>	24 <sup>A</sup>	

Tetracyclines	MIC breakpoint (mg/L)		Disk content (µg)	Zone diameter breakpoint (mm)		Notes Numbered notes relate to general comments and/or MIC breakpoints. Lettered notes relate to the disk diffusion method.
	S ≤	R >		S ≥	R <	
Doxycycline	Note <sup>1</sup>	Note <sup>2</sup>		Note <sup>A</sup>	Note <sup>A</sup>	1/A. Tetracycline can be used to determine susceptibility to doxycycline.
Tetraacycline	2 <sup>1</sup>	2 <sup>1</sup>	30	30 <sup>A</sup>	30 <sup>A</sup>	

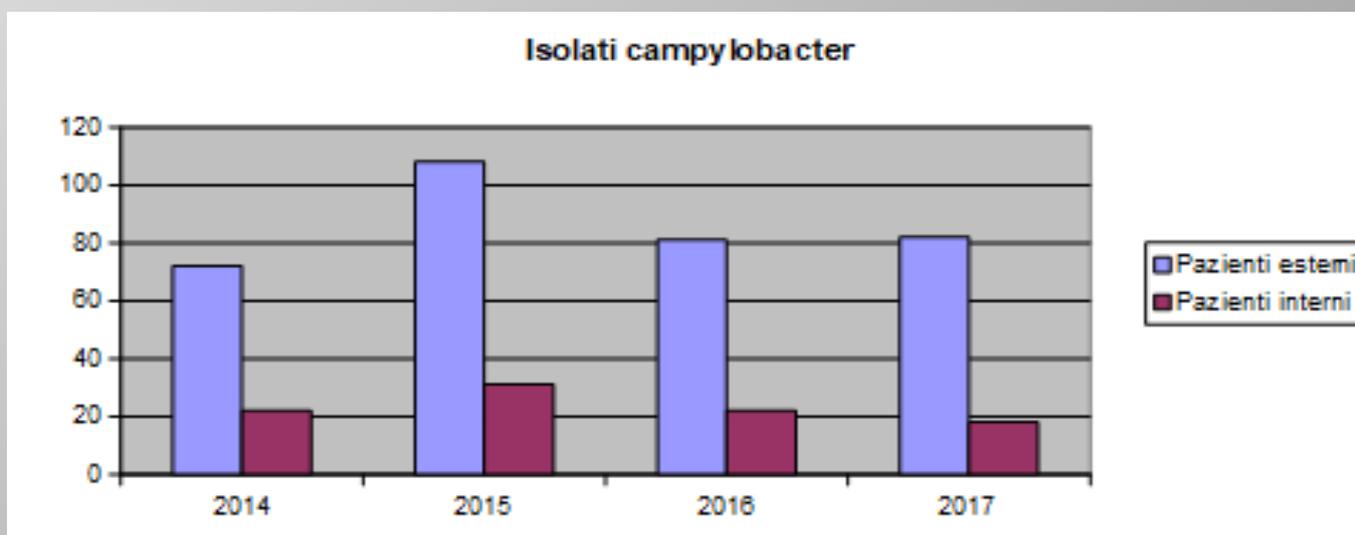
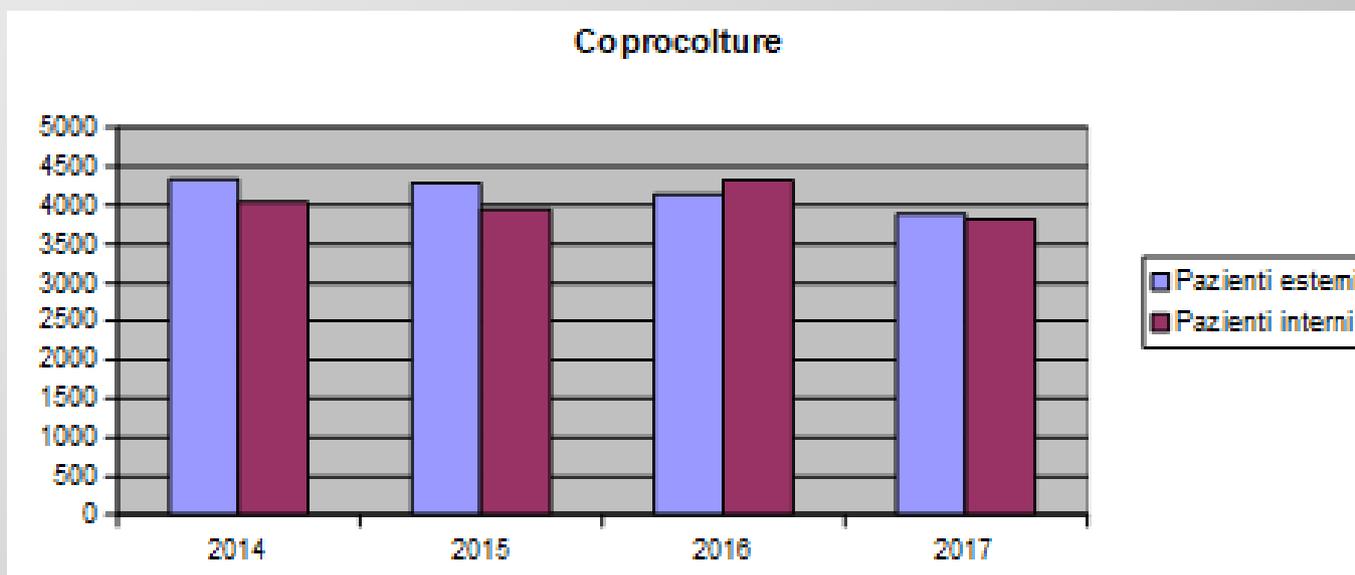
# *Campylobacter spp* a Padova

- La UOC di Microbiologia e Virologia dell'Azienda Ospedaliera esegue coprocolture su campioni di pazienti ricoverati o in regime ambulatoriale.
- La ricerca di *Campylobacter spp* viene eseguita di routine su tutte le coprocolture (incubazione a 42°C in microaerofilia per 48h).
- Nel periodo 2013-2017 tutti gli isolati appartenevano alle specie *C. jejuni* o *C. coli* tranne un isolato di *C. fetus* da emocoltura.

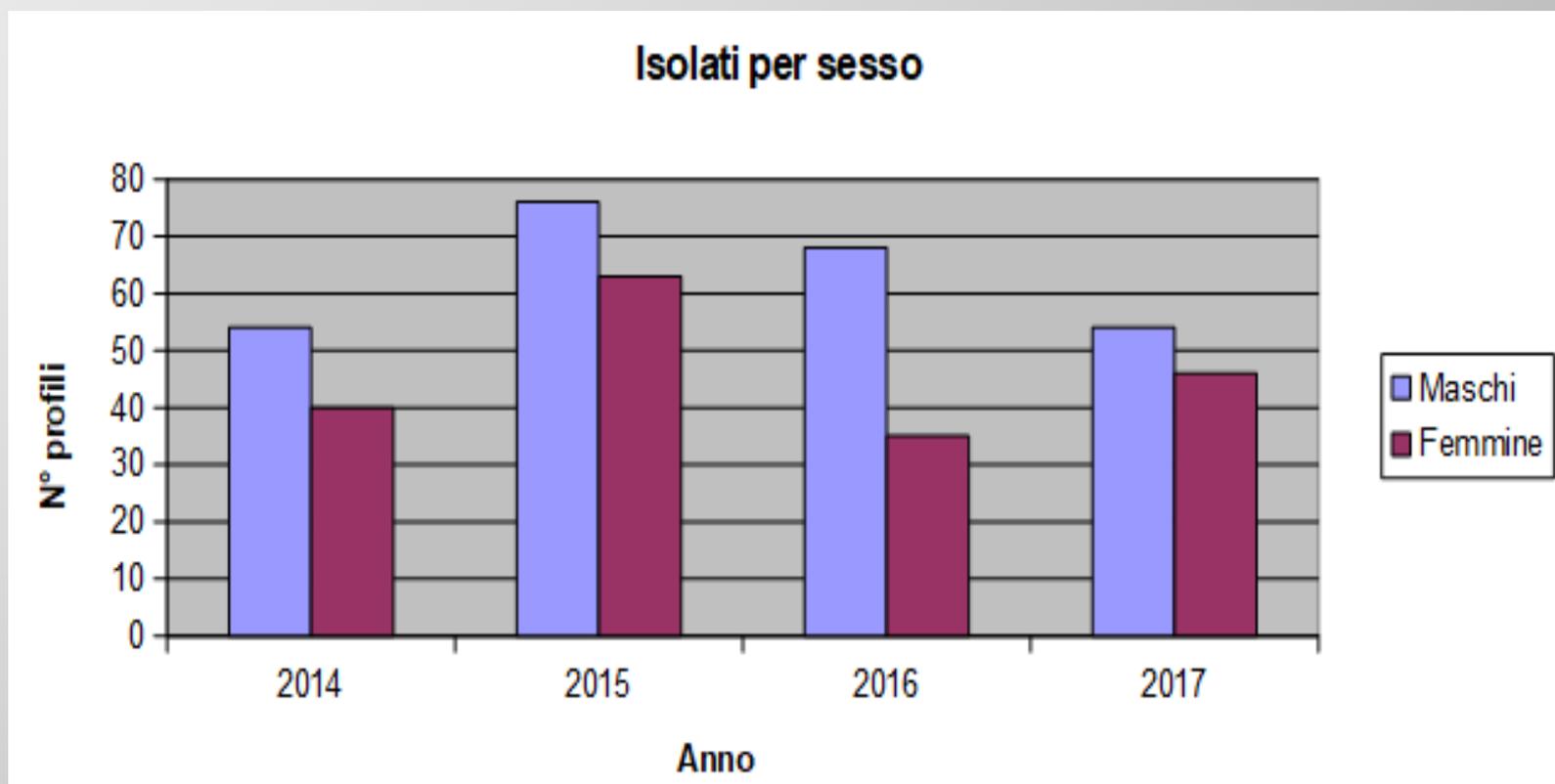
# Distribuzione temporale degli isolati 2014-2017



# Pazienti interni o ambulatoriali

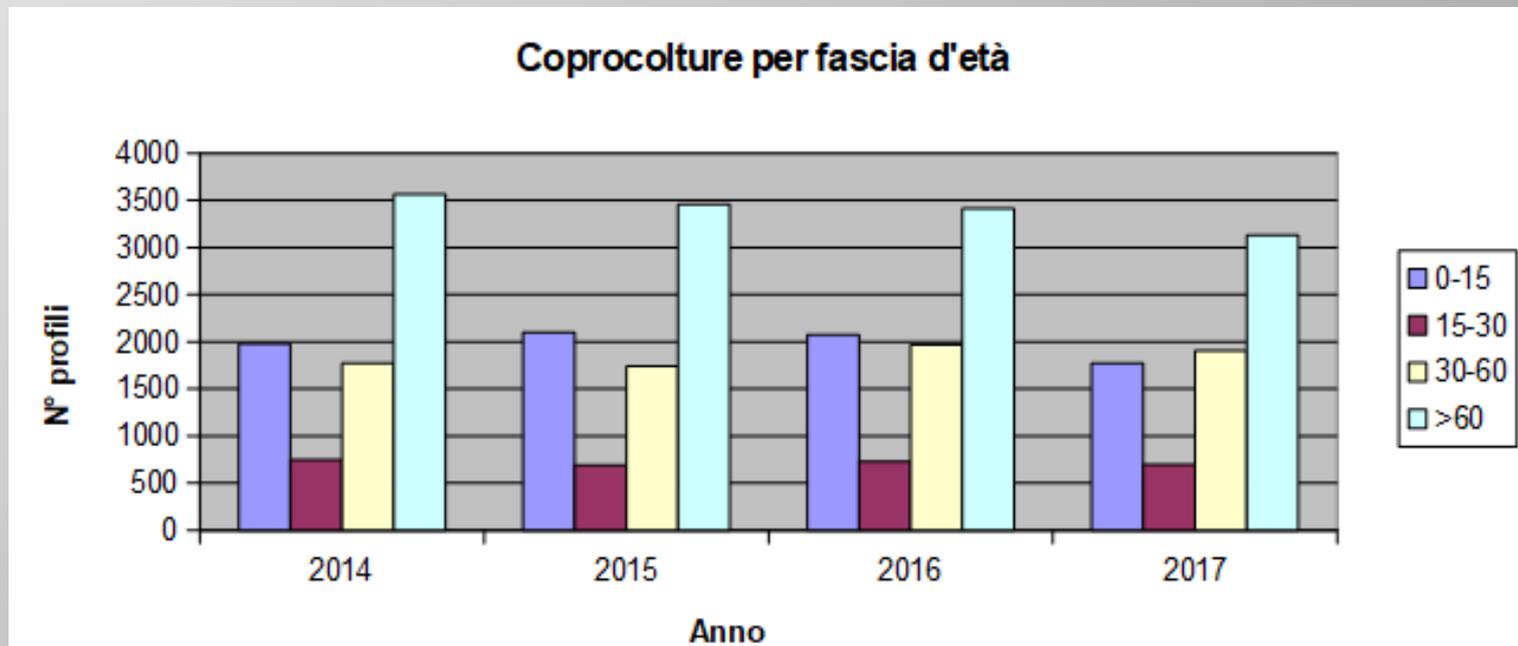


# Distribuzione per sesso



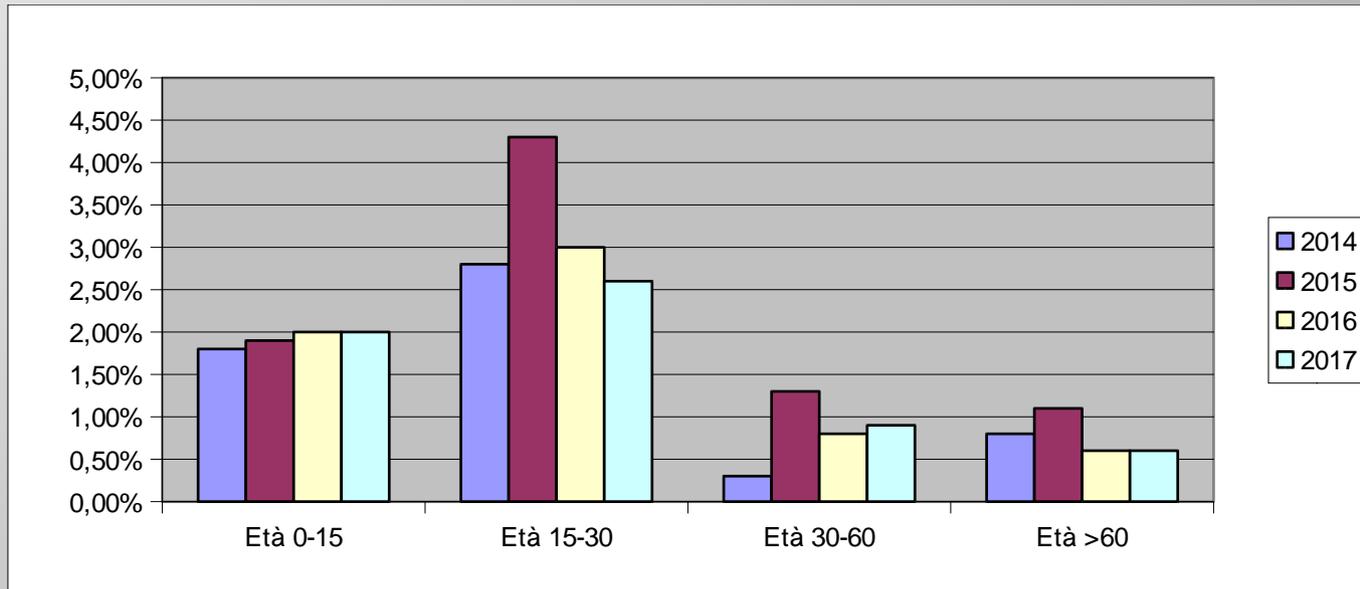
# Distribuzione per fasce d'età

- La distribuzione per fasce d'età dei pazienti per cui viene richiesta una coprocoltura si mantiene stabile, con preponderanza di soggetti pediatrici e soprattutto anziani.



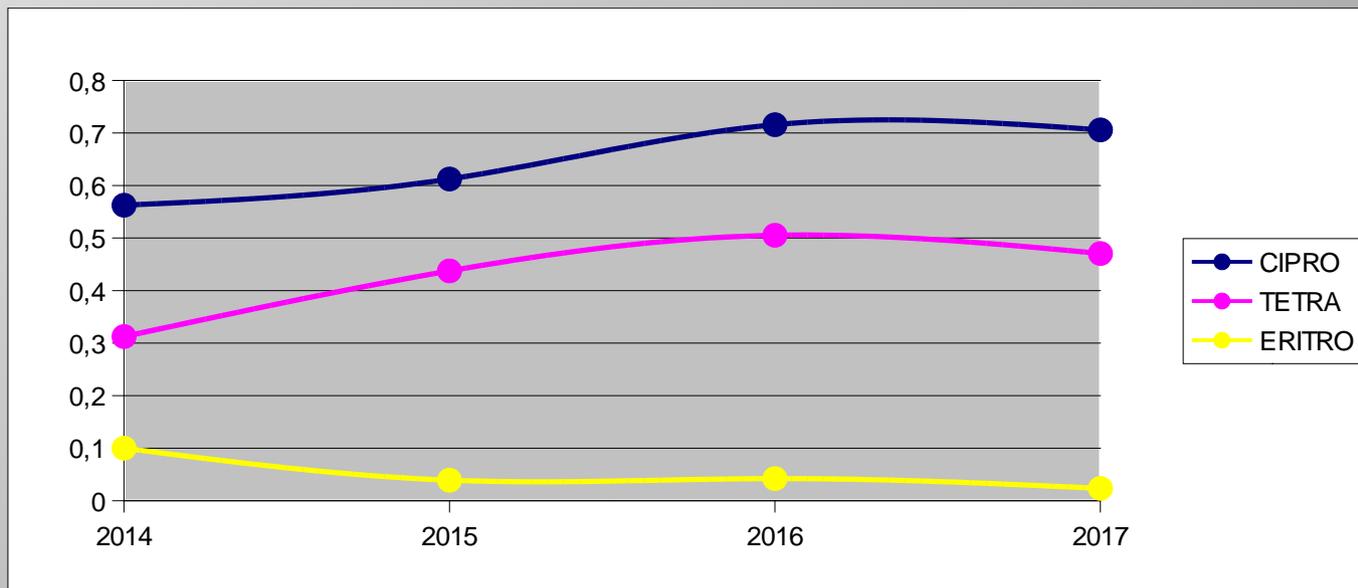
# Distribuzione per fasce d'età

- La percentuale di colture positive per *Campylobacter* è però maggiore nei giovani adulti.



# Farmacoresistenza

- In linea con quanto osservato nel Sud Europa, elevata prevalenza di resistenza alla ciprofloxacina.
- Si mantiene bassa la resistenza ai macrolidi.



# *Campylobacter coli*

- Nel periodo in esame 22 isolati C. coli (13 nel 2016 e 9 nel 2017)
- In linea con quanto riportato in letteratura, C. coli ha un maggiore tasso di antibiotico resistenza.
- Le variazioni annuali risultano maggiori per il basso numero di campioni positivi.

	2016	2017
R eritromicina	30,77%	11,11%
R ciprofloxacina	100%	77,78%
R tetraciclina	92,31%	55,6%

# Multiresistenza

Tra il 2014 e il 2017 19 isolati di *C. jejuni* e 4 di *C. coli* resistenti a eritromicina.

14/19 ceppi di *C. jejuni* e 4/4 di *C. coli* risultavano resistenti anche a ciprofloxacina e tetraciclina.

Nei casi in cui sono stati testati altri farmaci, MIC bassa a gentamicina e carbapenemi (imipenem)

# Basi molecolari della resistenza

- 99 isolati del periodo 2014-2016 analizzati
- Ricerca tramite PCR della mutazione T86I nel gene *gyrA* (resistenza alla ciprofloxacina: 53/66 isolati)
- Ricerca tramite PCR di tetO (resistenza alla tetraciclina: 44/44 isolati)
- Sequenziamento gene rRNA 23S su 4 isolati (resistenza a eritromicina: in corso)

# Conclusioni

- L'epidemiologia dei ceppi di *Campylobacter* isolati a Padova si inserisce nel più ampio contesto (sud) europeo.
- Rimangono diverse questioni aperte, ad es:
- Qual è il reale tasso di positività? (utilizzo in routine del solo metodo colturale).
- Impatto delle infezioni da *Campylobacter spp* diversi da *C.coli* e *C.jejuni*
- Qual è il contributo della terapia antibiotica clinica e dell'utilizzo di antibiotici negli animali da allevamento all'insorgere delle resistenze?

# Bibliografia

- EFSA (European Food Safety Authority) and ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control), 2017. “The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2015.” *EFSA Journal* 2017;15(2):4694,212 pp.
- Cha, Wonhee, et al. “Antimicrobial susceptibility profiles of human *Campylobacter jejuni* isolates and association with phylogenetic lineages”. *Frontiers in microbiology* 7 (2016).
- Kaakoush, Nadeem O., et al. “Global epidemiology of *Campylobacter* infection”. *Clinical microbiology reviews* 28.3 (2015): 687-720.
- Cody, Alison J., et al. "A longitudinal 6-year study of the molecular epidemiology of clinical *Campylobacter* isolates in Oxfordshire, United Kingdom." *Journal of clinical microbiology* 50.10 (2012): 3193-3201.
- Fitzgerald, Collette. "Campylobacter." *Clinics in laboratory medicine* 35.2 (2015): 289-298.

# Ringraziamenti

- Dott. Cristiano Salata<sup>1,2</sup>
- Dott.ssa Valeria Michela Besutti<sup>2</sup>
- Dott.ssa Lucia Rossi<sup>2</sup>
- Dott.ssa Maria Vittoria Salvati<sup>1</sup>
- Dott.ssa Alessandra Piccirillo<sup>3</sup>
- Prof.ssa Cristina Parolin<sup>1</sup>, direttore Dipartimento di Medicina Molecolare, Università degli Studi di Padova
- Prof. Giorgio Palù<sup>1,2</sup>, direttore U.O.C Microbiologia e Virologia, Azienda Ospedaliera di Padova

1Dipartimento di Medicina Molecolare, Università degli Studi di Padova

2U.O.C Microbiologia e Virologia, Azienda Ospedaliera di Padova

3Dipartimento di Biomedicina Comparata e Alimentazione, Università degli Studi di Padova

Grazie per l'attenzione!