



IMMAGINE REALIZZATA DA ANDREA FRANCESCO DE BENE E CARLO ROMAGNOLI CON L'AUSILIO DELL'IA

LINEE GUIDA SULLA DIAGNOSI DI CAMPILOBATTERIOSI NELL'UOMO

A cura di: Marta Bivona¹, Tatiana Bogdanova¹, Valeria Russini¹, Aurora Garcia-Fernandez², Patricia Alba³, Virginia Carfora³, Alessia Franco³, Antonio Battisti³, Giuliano Garofolo⁴, Laura Villa², Maria Laura De Marchis¹, Teresa Bossù¹

1. UOC Direzione Operativa Microbiologia degli alimenti, Centro di riferimento Regionale per gli Enterobatteri Patogeni (CREP), Laboratorio di riferimento Regionale per i Patogeni a Trasmissione Alimentare di origine Umana (LRPTAU), Laboratorio di riferimento Regionale per le Malattie a Trasmissione Alimentare (LRMTA), Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana "M. Aleandri"
2. Dipartimento di Malattie Infettive, Istituto Superiore di Sanità
3. UOC Direzione Operativa Diagnostica Generale, UOS Diagnostica e caratterizzazione molecolare, Laboratorio di Riferimento Nazionale (NRL-AR) e Centro di Riferenza Nazionale per l'Antibiotico resistenza (CRN-AR), Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana "M. Aleandri"
4. Bacteriology Unit, NRL Campylobacter/WOAH Reference Laboratory for Brucellosis, Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise "G. Caporale"

INDICE

1. LA CAMPILOBATTERIOSI.....	1
2. GESTIONE DELLA CAMPILOBATTERIOSI IN ITALIA: IL FLUSSO DELLE NOTIFICHE E LA SORVEGLIANZA DI LABORATORIO	2
3. LA DIAGNOSI DELLA CAMPILOBATTERIOSI: METODICHE DI LABORATORIO	5
3.1 METODI DI SCREENING RAPIDO PER LA DIAGNOSI DI CAMPYLOBACTER	5
3.2 ESAME COLTURALE DI CAMPYLOBACTER SPP.	5
3.3 METODI DI ISOLAMENTO DI CAMPYLOBACTER SPP. DA FECI E DA EMOCOLTURA	7
3.3.1 Isolamento da feci	7
3.3.2 Isolamento da emocoltura	8
4. IDENTIFICAZIONE DI SPECIE E TIPIZZAZIONE DI CAMPYLOBACTER SPP.	9
4.1 IDENTIFICAZIONE DI SPECIE CON METODI BIOCHIMICI	9
4.2 IDENTIFICAZIONE DI SPECIE CON METODI BIOMOLECOLARI	9
4.3 IDENTIFICAZIONE DI SPECIE TRAMITE SPETTROMETRIA DI MASSA	9
4.4 TEST DI DETERMINAZIONE DELLA SENSIBILITA' AGLI ANTIBIOTICI	10
4.5 CARATTERIZZAZIONE DI CEPPI DI CAMPYLOBACTER SPP. TRAMITE SEQUENZIAMENTO DI NUOVA GENERAZIONE (NGS)	13
5. METODI DI CONSERVAZIONE DEGLI ISOLATI DI CAMPYLOBACTER SPP.	14
6. TRASPORTO DEGLI ISOLATI BATTERICI	15
7. BIBLIOGRAFIA.....	15

1. LA CAMPILOBATTERIOSI

La campilobatteriosi è una malattia zoonotica provocata dal batterio *Campylobacter* spp., che causa gastroenterite di origine alimentare nell'uomo (El Baaboua et al., 2022).

Le specie *C. jejuni* e *C. coli* sono le più rilevanti, responsabili di circa il 90% dei casi. L'infezione provoca una gastroenterite autolimitante, caratterizzata da diarrea, crampi addominali e febbre (Gazaigne et al., 2008). Le complicazioni sono rare e possono includere la sindrome dell'intestino irritabile, inclusa la malattia di Crohn e la colite ulcerosa. In alcuni casi, nei pazienti più anziani o immunocompromessi, possono manifestarsi ulteriori complicazioni post-infezione, come la sindrome di Guillain-Barré (GBS) e la sindrome di Miller-Fisher (MFS) (Scallan et al., 2015). La specie *C. fetus* si distingue dalle altre più comuni perché raramente induce sintomi gastrointestinali, ed è anzi causa di un'infezione del flusso sanguigno a causa del particolare tropismo di questo organismo nei confronti dell'endotelio vascolare. L'infezione da *C. fetus* risulta spesso associata a danni cardiovascolari (Gazaigne et al., 2008).

Campylobacter spp. si trova nel tratto intestinale di molti animali sani, in particolare negli uccelli, ed i veicoli alimentari più comuni sono la carne di pollame, il latte non pastorizzato e l'acqua non trattata (El Baaboua et al., 2022; Joensen et al., 2020). Anche il contatto con animali malati o feci contaminate rientra nella via di trasmissione all'uomo (Mughini-Gras et al., 2021).

I Report dell'Autorità Europea sulla Sicurezza Alimentare (EFSA) e del Centro Europeo per la prevenzione e il Controllo delle Malattie (ECDC) indicano che la campilobatteriosi è l'infezione gastrointestinale di origine alimentare più comunemente segnalata nell'uomo nell'Unione Europea ed è in costante aumento: nel 2023 sono stati notificati 148.181 casi confermati di campilobatteriosi umana (11.074 casi in più rispetto all'anno precedente 2022), con un tasso di notifica di 45,7 casi per 100.000 abitanti (EFSA & ECDC, 2023, 2024).

In base alla Decisione di esecuzione (UE) 2018/945 della Commissione Europea del 22 giugno 2018 relativa alle malattie trasmissibili e ai problemi sanitari speciali connessi da incorporare nella sorveglianza epidemiologica, nonché alle pertinenti definizioni di caso, si definisce come "caso confermato di enterite da *Campylobacter*" qualsiasi persona che soddisfi i criteri clinici e di laboratorio. Questi ultimi includono sia isolamento di *Campylobacter* spp. patogeno per l'uomo, che l'identificazione dell'acido nucleico di *Campylobacter* spp. in un campione clinico. Si raccomanda inoltre che i test di suscettibilità

antimicrobica di *Campylobacter* spp. siano effettuati su un sottoinsieme rappresentativo di isolati.

Oltre alla possibilità di verificare la suscettibilità antimicrobica, la disponibilità di isolati di *Campylobacter* spp. garantisce anche quella di caratterizzare geneticamente il ceppo di appartenenza, al fine di determinarne il profilo di patogenicità e l'inclusione in eventuali cluster epidemici.

Per i suddetti motivi, è importante che i laboratori ospedalieri pubblici e privati dispongano di efficienti metodi di diagnosi, isolamento, conservazione e trasporto dei ceppi di *Campylobacter* spp.

2. GESTIONE DELLA CAMPILOBATTERIOSI IN ITALIA: IL FLUSSO DELLE NOTIFICHE E LA SORVEGLIANZA DI LABORATORIO

La campilobatteriosi è tra le malattie infettive soggette a segnalazione, secondo il Decreto Ministeriale 7 marzo 2022 "Revisione del sistema di segnalazione delle malattie infettive (PREMAL)" (GU Serie Generale n.82 del 07-04-2022). Attraverso il sopra menzionato decreto è stato disposto il superamento della divisione in classi delle malattie infettive, ai fini della notifica prevista dal Decreto Ministeriale 15 dicembre 1990, e sono state definite schede specifiche per la segnalazione di diverse zoonosi di origine alimentare, in precedenza ricomprese in un'unica classe a notifica annuale. Il decreto definisce i criteri epidemiologici, clinici e di laboratorio ai fini della classificazione dei casi da parte del sistema come "possibili", "probabili" e "confermati", in linea con la sopracitata Decisione della Commissione Europea del 22 giugno 2018 n. 945. Si evidenzia come la classificazione del caso sia specifica per la patologia e, seppur in generale risulti confermato il caso che risponda sia al criterio clinico che a quello di laboratorio, non sempre siano richiesti entrambi i criteri per la classificazione di un "caso confermato". Si specifica, inoltre, che le segnalazioni effettuate sul sistema PREMAL prevedono un processo di validazione a vari livelli. I dati diventano definitivi solo dopo essere stati validati da ASL, Regioni/P.A. e Ministero. La prima validazione, da parte della ASL, rende la segnalazione una notifica ufficiale.

Secondo le indicazioni del Ministero della Salute, le segnalazioni che non hanno ancora terminato il processo di validazione da parte di tutti i livelli competenti, sono considerate "temporanee", in quanto ancora passibili di cambiamenti e integrazioni. Il predetto flusso informativo consente l'invio dei dati alle agenzie sovranazionali EU (ECDC ed EFSA per i

Joint Reports) in ottemperanza alla normativa vigente, ed agli organismi internazionali (OMS).

Il sistema permette, oltre alla segnalazione di casi sporadici, anche l'associazione di questi in focolai epidemici. In particolare, la direttiva n. 2003/99/CE e il relativo D.L.vo di recepimento n. 191/2006 dispongono l'invio alla Commissione Europea dei dati di sorveglianza dei Focolai di tossinfezione alimentare da parte dei Paesi Membri. Il medico, che, nell'esercizio delle sue funzioni, rilevi un caso di malattia infettiva, diffusiva o sospetta di esserlo, ha l'obbligo di segnalazione alla struttura preposta dell'Azienda sanitaria competente per territorio, secondo i tempi e i modi dettati dalle misure di sanità pubblica applicabili e specificati nel decreto. La segnalazione è corredata dai dati indispensabili per l'adozione di successive azioni a tutela della salute pubblica per la prevenzione e il controllo delle malattie infettive (informazioni sulla malattia, dati identificativi del paziente e dettagli diagnostici), garantendo un livello di sicurezza adeguato al rischio a garanzia della riservatezza e confidenzialità dei dati trattati secondo Reg. (EU) 2016/679 (GDPR), tali da assicurare l'integrità del contenuto della segnalazione e la certezza del destinatario della stessa, tramite l'utilizzo della scheda di segnalazione disponibile nel sistema PREMAL. Il Servizio di Igiene Pubblica della ASL è responsabile dell'inserimento e integrazione delle segnalazioni, oltre a condurre le indagini epidemiologiche necessarie. Le informazioni vengono inserite nel sistema PREMAL tramite un'applicazione web, mentre per le Regioni di seguito elencate, tramite cooperazione tra i sistemi informativi delle Regioni e il sistema stesso: Lombardia, Veneto, Puglia, Friuli-Venezia Giulia ed Emilia-Romagna (<https://www.salute.gov.it/portale/malattieInfettive/dettaglioContenutiMalattieInfettive.jsp?lingua=italiano&id=650&area=Malattie%20infettive&menu=sorveglianza>, ultima data di accesso:16/03/2025).

Parallelamente, esiste una sorveglianza nazionale di laboratorio su base volontaria, per la notifica degli isolati di *Campylobacter* spp. da uomo, denominata Sorveglianza Enter-Net Italia, localizzata presso il Dipartimento di Malattie Infettive dell'Istituto Superiore di Sanità (ISS). È quindi altamente consigliato notificare i casi di campilobatteriosi a questo sistema attraverso i Laboratori di Riferimento Regionale. Nel Lazio, il Laboratorio di Riferimento Regionale dei seguenti patogeni a trasmissione alimentare di origine umana: *L. monocytogenes*, *Campylobacter* spp., *Escherichia coli* STEC, *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio* spp. e *Shigella* spp. (LRPTAU) ed il Laboratorio Regionale di riferimento per le Malattie a Trasmissione Alimentare (LRMTA) sono stati formalmente riconosciuti dalla Regione Lazio con la Determinazione Regionale n. G06447 del 28 maggio 2021 e hanno sede presso

l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana "M. Aleandri". Il LRPTAU e il LRMTA afferiscono all'Unità Operativa Complessa "Microbiologia degli Alimenti" dell'IZSLT, contribuendo così a una sorveglianza integrata ed efficace delle malattie infettive di origine alimentare. La notifica avviene tramite la compilazione e l'invio all'LRPTAU, da parte dei laboratori di microbiologia e dei servizi sanitari locali, della "Scheda Enter-Net Italia" (reperibile al link <https://www.izslt.it/crep/modulistica/> ultima data di accesso:16/03/2025) dove devono essere inseriti dati essenziali del paziente e dell'isolato. È parimenti fortemente raccomandato l'isolamento del ceppo di *Campylobacter* spp. ed il suo invio al LRPTAU per l'identificazione di specie (là dove non sia già stata effettuata) e per l'esecuzione di ulteriori analisi fenotipiche e genotipiche. Tutti i dati epidemiologici, fenotipici e genotipici raccolti ed effettuati (determinazione di specie, analisi dell'antibiotico resistenza, sequenziamento dell'intero genoma o *Whole Genome Sequencing-WGS*) sono usati per il monitoraggio regionale della campilobatteriosi, per la realizzazione di report regionali (<https://www.izslt.it/crep/report-e-pubblicazioni/> ultima data di accesso:16/03/2025) e sono comunicati tempestivamente, tramite una piattaforma digitale, al Coordinamento Enter-Net Italia. Insieme a tutti i dati epidemiologici, gli isolati ricevuti dal LRPTAU sono inviati con cadenza trimestrale al Coordinamento Enter-Net Italia, con un campionamento casuale ed una rappresentatività di 1 su 10. Questo approccio non solo consente di garantire una rappresentazione adeguata degli isolati per l'analisi e la caratterizzazione, ma permette anche la conservazione di questi campioni nella biobanca nazionale Enter-Net Italia. Questa biobanca fungerà da risorsa per eventuali future ricerche, consentendo studi approfonditi sull'antibiotico resistenza e l'epidemiologia di *Campylobacter* spp.

Il Coordinamento Enter-Net Italia si occupa dell'analisi e del controllo dei dati ricevuti per il monitoraggio della campilobatteriosi in Italia. Oltre a fornire assistenza ai Centri di Riferimento Regionali, il coordinamento pubblica i dati raccolti attraverso la creazione di report nazionali, contribuendo così a una migliore comprensione e gestione della campilobatteriosi a livello nazionale (Lucarelli et al., 2024; Luzzi et al., 2017).

Il Coordinamento si occupa di eseguire ulteriori analisi fenotipiche e genotipiche, là dove sia necessario, contribuendo inoltre al monitoraggio dell'antibiotico resistenza. I dati epidemiologici e di antibiotico resistenza sono poi trasmessi annualmente all'ECDC tramite il sistema TESSy, garantendo che le informazioni siano aggiornate e complete e contribuendo al monitoraggio europeo della campilobatteriosi oltreché alla realizzazione di report europei che aggregano informazioni provenienti dai diversi paesi dell'Unione Europea (EFSA & ECDC, 2023, 2024). In caso di possibili focolai nazionali o internazionali segnalati

dall'ECDC tramite allerte EpiPulse, la sorveglianza Enter-Net Italia, in collaborazione con il LRMTA, potrebbe richiedere ai laboratori sul territorio di prestare particolare attenzione ai casi diagnosticati di campilobatteriosi. Questo consentirà di effettuare tempestive notifiche e l'invio dei ceppi per le necessarie indagini epidemiologiche e la tipizzazione molecolare a livello regionale e nazionale. Le informazioni raccolte saranno comunicate all'ECDC attraverso i sistemi TESSy ed EpiPulse, garantendo una risposta coordinata e tempestiva nella gestione delle campilobatteriosi.

3. LA DIAGNOSI DELLA CAMPILOBATTERIOSI: METODICHE DI LABORATORIO

3.1 METODI DI SCREENING RAPIDO PER LA DIAGNOSI DI CAMPYLOBACTER

L'individuazione qualitativa di *Campylobacter* spp. in campioni di feci o tamponi fecali può essere effettuata utilizzando pannelli commerciali sindromici, metodi rapidi di screening che rilevano la presenza di antigeni specifici per *Campylobacter* spp. (test antigenici immunocromatografici o ELISA) o del suo genoma (test molecolari immunocromatografici o test molecolari per pannelli enterici basati su metodiche di Real Time PCR, multiplex PCR o tecnologia Luminex), preferibilmente approvati dai regolamenti dell'UE. I test molecolari possono essere disegnati per la rilevazione del solo genere *Campylobacter* spp., di alcune specie appartenenti al genere *Campylobacter* spp., o per riconoscere un più ampio pannello di patogeni gastrointestinali che comprende anche il *Campylobacter* spp.

I pannelli sindromici consentono una diagnosi eziologica rapida rispetto alla coltura tradizionale e possono offrire adeguati livelli di sensibilità e specificità. Tuttavia, è fortemente raccomandata un'attenta valutazione dei risultati e l'esecuzione di un esame colturale per *Campylobacter* spp. Quest'ultimo permette di isolare il patogeno, determinarne la specie, studiarne la resistenza agli antibiotici e, se necessario, condurre approfondimenti tramite Whole Genome Sequencing (WGS), essenziali per monitorare la diffusione di cloni epidemici a livello nazionale e internazionale (AMCLI ETS, 2023a).

3.2 ESAME COLTURALE DI CAMPYLOBACTER SPP.

Al genere *Campylobacter* spp. appartengono batteri microaerofili, sensibili all'ossigeno, la cui crescita richiede un'atmosfera caratterizzata dal 10% di anidride carbonica (CO₂), il 5% di ossigeno (O₂) e l'85% di azoto (N₂) durante il periodo di incubazione. I tempi di crescita delle specie appartenenti al genere *Campylobacter* spp. sono più lunghi rispetto ad altri

microorganismi appartenenti all'ordine degli Enterobacterales e per questa ragione, è necessario effettuare colture della durata di almeno 48 ore (Davis et al. 2008). La temperatura di crescita per le diverse specie di *Campylobacter* spp è variabile e compresa tra i 25°C e i 42°C. Questa condizione può essere utilizzata anche come strumento di selezione per una determinata specie (il *C. fetus* cresce a 25°C e 37°C ma non a 42°C, i *Campylobacter* spp. termotolleranti come *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari* e *C. upsaliensis* crescono a 37°C e a 42°C ma non a 25°C).

Per ottenere la crescita di *Campylobacter* spp., si raccomanda quindi di incubare le piastre a diverse temperature (25°C, 37°C e/o 42°C, a seconda della specie ricercata e della matrice di isolamento), in termostati che consentano di impostare un ambiente microaerofilo (10% CO₂ e 5% O₂) o sigillando la piastra in presenza di una bustina generatrice di microaerofilia, per 48-72 h (Samosornsuk et al., 2015).

Per condurre l'esame colturale, è preferibile l'utilizzo di mezzi di crescita selettivi con o senza sangue, contenenti una miscela di composti antimicrobici, come il Butzler's, il Bolton, lo Skirrow, il Preston, l'agar Carbone-Cefoperazone-Deossicolato (*Charcoal-Cefoperazone-Deoxycholate Agar* - CCDA) (Bolton et al., 1999; Gharst et al., 2013; Hutchinson & Bolton, 1984; Skirrow, 1977). A volte, tuttavia, i terreni selettivi possono inibire la crescita di alcuni ceppi di *C. jejuni* e *C. coli* e anche molte delle altre specie meno frequenti, quali *C. upsaliensis*, *C. hyointestinalis* e *C. fetus* (Maher et al., 2003).

Quando il processo di isolamento di *Campylobacter* spp. risulta difficoltoso e/o quando la carica batterica nel campione è ridotta, si possono prendere in considerazione molte formulazioni di brodi di arricchimento da utilizzare prima della fase di isolamento, come ad esempio il brodo Bolton. Gli organismi microaerofili, come appunto *Campylobacter* spp., tendono ad essere più sensibili alle forme tossiche di ossigeno; il brodo Bolton, insieme ai suoi ingredienti nutrizionali, contiene composti che migliorano l'aerotolleranza dei batteri microaerofili sopprimendo la forma tossica dell'ossigeno (El Baaboua et al., 2022). Per facilitare l'isolamento di tutte le specie di *Campylobacter* spp., i mezzi di coltura utilizzati sia per l'isolamento che per l'arricchimento, sono generalmente supplementati con agenti antimicrobici. Questi ultimi sono destinati a sopprimere i batteri aerobici e/o anaerobici Gram positivi e/o negativi presenti nella flora fecale normale, come il cefoperazone, il trimetoprim e la vancomicina, o a prevenire la crescita di lieviti e muffe, come l'amfotericina B e la cicloheximide (Chon et al., 2013; El Baaboua et al., 2022; Kim et al., 2016).

Se è necessario effettuare uno screening diagnostico rapido possono essere utilizzati agar cromogenici selettivi (Seliwiorstow et al., 2014).

Il Columbia Agar sangue è uno dei terreni non selettivi maggiormente utilizzati per ripassare le colonie isolate di *Campylobacter* spp. da sottoporre a conferma. Le colonie che crescono in questo terreno di coltura appaiono di colore grigio chiaro (Davis & DiRita, 2008).

3.3 METODI DI ISOLAMENTO DI CAMPYLOBACTER SPP. DA FECI E DA EMOCOLTURA

Quando le manifestazioni cliniche sono di tipo gastrointestinale, il campione di riferimento è rappresentato dalle feci. In casi più rari si esaminano altri campioni clinici, tra cui le emocolture ed il liquor. Per quest'ultima tipologia di campione non esistono protocolli standardizzati ma si può fare riferimento alla letteratura specifica (Talbi et al., 2021)

3.3.1 Isolamento da feci

L'isolamento di *Campylobacter* spp. da campioni fecali umani interessa maggiormente le specie *C. jejuni*, *C. coli*, *C. upsaliensis* e *C. lari*, che danno tipicamente sintomatologia a livello del sistema digerente, come gastroenteriti e diarree.

Poiché il *Campylobacter* spp. richiede condizioni di crescita particolari, è necessario adottare metodologie ottimali anche per il prelievo e il trasporto dei campioni da analizzare. Innanzitutto, si raccomanda di raccogliere i campioni su una superficie pulita in quantità sufficiente (0,5-2 g, 5-10 ml) e prima dell'eventuale assunzione di antibiotici. I campioni non devono essere contaminati con urine, con l'acqua dei sanitari o con carta igienica. Anche il mezzo di trasporto e la temperatura di conservazione sono fattori importanti da considerare al fine di massimizzare il recupero di *Campylobacter* spp. Rispetto ai sistemi di trasporto disponibili in commercio, nel loro lavoro, Hirvonen e Kaukoranta, hanno valutato l'efficienza di recupero di *Campylobacter* spp. da campioni fecali umani conservati in diverse tipologie di dispositivi, a 4°C e a 25°C. I risultati hanno mostrato una performance leggermente migliore per il sistema FecalSwab, che ha consentito il recupero di cellule vitali sia di *C. jejuni* che di *C. coli* dai campioni conservati a 4°C e incubati per 48 ore (Hirvonen & Kaukoranta, 2014). In alternativa può essere utilizzato un tampone intinto nelle feci e conservato in terreno di trasporto Carey-Blair o equivalenti (AMCLI ETS, 2023b). I risultati di diversi studi confermano che, in linea generale, la conservazione delle feci a 4°C risulta migliore della conservazione a 25°C (Blaser et al., 1980; Goossens et al., 1984; Salim et al., 2014; Wang et al., 1983). Per cui, se i campioni fecali non possono essere processati immediatamente, se ne raccomanda la conservazione a 4°C per un massimo di 24-48 ore. Per l'isolamento di *Campylobacter* spp. da feci sono stati individuati diversi protocolli di allestimento del materiale fecale. Se le feci risultano diarroiche, è possibile effettuare il

prelievo con un'ansa sterile che può essere inoculata direttamente su terreno selettivo. Se invece le feci sono solide è necessario omogeneizzare il campione in soluzione salina o in brodo nutritivo (es: brodo Brucella), mescolando con un tampone, e procedere quindi con l'inoculo su terreno selettivo (Goossens et al., 1984).

Nel caso in cui si sospetti la presenza di una bassa carica microbica vitale si può procedere con incubazione delle feci in un brodo di arricchimento (es: Preston o Bolton) per 24-48 h in ambiente microaerofilo a 37°C e/o 42°C.

Per favorire l'isolamento di *Campylobacter* spp., date le piccole dimensioni di questo batterio che vanno da 0,3 a 0,6 µm di diametro, la sospensione fecale può essere sottoposta ad un passaggio opzionale di filtrazione. La sospensione può essere filtrata con un filtro a membrana applicato ad una siringa con pori da circa 0,45 µm. In alternativa è possibile piastrare 0,5-1 ml di sospensione su una membrana sterile in acetato di cellulosa con pori da 0,65 µm, deposta sulla piastra di terreno selettivo, e sottoporre il campione ad un'incubazione a 37°C e/o 42°C in ambiente microaerofilo per 1-2 h, rimuovendo successivamente la membrana e proseguendo l'incubazione per 48 h (APHL association of public health laboratories, 2023; Salim et al., 2014).

3.3.2 Isolamento da emocoltura

L'isolamento di *Campylobacter* spp. da emocoltura generalmente sottintende la ricerca dei ceppi appartenenti alla specie *C. fetus*, poiché è quest'ultima che tipicamente comporta infezioni sistemiche. Tuttavia è nota la capacità di causare batteriemia anche per le specie *C. coli* e *C. jejuni* (Gazaigne et al., 2008, Louwen et al., 2012).

La procedura prevede il prelievo del campione di sangue da vena periferica e l'inoculo in flaconi aerobici e anaerobici disponibili in commercio.

I campioni sono incubati in un sistema automatizzato entro 1 h dal prelievo (tempo medio di incubazione di 5 giorni). Successivamente sono selezionati i flaconi positivi per la crescita batterica.

È possibile a questo punto eseguire un esame diretto al microscopio, ricercando la presenza di bastoncelli a spirale gram-negativi, molto attivi nel movimento, e verificare la reazione positiva all'ossidasi e alla catalasi.

Si procede quindi all'inoculo su piastre di terreni non selettivi (es: agar Brucella, agar sangue Columbia o agar cioccolato) o direttamente su quelli selettivi per *Campylobacter* spp. e all'incubazione in condizioni di microaerofilia a 25°C, 37°C e a 42°C per 48-72 h.

4. IDENTIFICAZIONE DI SPECIE E TIPIZZAZIONE DI CAMPYLOBACTER SPP.

4.1 IDENTIFICAZIONE DI SPECIE CON METODI BIOCHIMICI

L'identificazione biochimica può essere effettuata tramite l'esecuzione di test specifici in macrometodo. Ad esempio, la ISO 10272-1:2017, che si applica alla ricerca dei *Campylobacter* termotolleranti (*C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari* e *C. upsaliensis*), indica il pannello di test da eseguire per differenziare queste 4 specie e verifica la reattività alla catalasi (debole o non presente nella specie *C. upsaliensis*), l'idrolisi dell'ippurato (positiva nella maggior parte dei ceppi di *C. jejuni*) e l'idrolisi dell'indossil acetato (negativa per la specie *C. lari*).

Per caratterizzare uno spettro più ampio di specie esistono sistemi di identificazione biochimica in micrometodo su galleria API o su sistema automatizzato associato a card di identificazione specifiche per batteri Gram negativi.

4.2 IDENTIFICAZIONE DI SPECIE CON METODI BIOMOLECOLARI

Esistono diversi protocolli in PCR (end-point PCR o Real time PCR) in grado di rilevare pannelli più o meno ampi di specie di *Campylobacter* spp.

Tali pannelli possono comprendere ad esempio le principali specie di *Campylobacter* termotolleranti (Ferrari et al., 2023; ISO 10272-2:2017/Amd 1:2023) o includere anche altre specie associate in generale ai casi di gastroenterite e di setticemia nell'uomo (Yamazaki-Matsune et al., 2007).

Una possibile alternativa a tali metodi è rappresentata dal sequenziamento diretto con metodica di Sanger di alcune regioni dei geni codificanti per l'rRNA 16S, a partire dal DNA estratto da isolato batterico. Grazie all'elevata specificità e versatilità di questi protocolli di sequenziamento è possibile discriminare la maggior parte delle specie esistenti di *Campylobacter* spp. (Gorkiewicz et al., 2003).

4.3 IDENTIFICAZIONE DI SPECIE TRAMITE SPETTROMETRIA DI MASSA

Negli ultimi anni, la spettrometria di massa MALDI-TOF è emersa come nuova tecnologia di riferimento per l'identificazione di specie, dimostrandosi uno strumento molto valido grazie alla sua riproducibilità, velocità e sensibilità nell'analisi. Il vantaggio del MALDI-TOF rispetto ad altri metodi di identificazione è che i risultati dell'analisi sono disponibili in poche ore, anziché in diversi giorni. La velocità, la semplicità nella preparazione dei campioni e

nell'acquisizione dei risultati, unite ai costi minimi dei consumabili, rendono questo metodo particolarmente adatto per la routine di laboratorio.

Attualmente, sul mercato, esistono diversi spettrometri di massa MALDI-TOF dotati di moduli di analisi creati *ad-hoc* per l'identificazione di specie batteriche e associati a database di riferimento che comprendono ampi pannelli di specie di *Campylobacter* spp. potenzialmente caratterizzabili.

4.4 TEST DI DETERMINAZIONE DELLA SENSIBILITA' AGLI ANTIBIOTICI

Le linee guida dell'ECDC per i test di sensibilità agli antibiotici (detti anche "antibiogrammi") in *Campylobacter* spp. stabiliscono procedure standardizzate per garantire risultati affidabili e comparabili. È essenziale utilizzare metodi riconosciuti, e selezionare le molecole di antibiotici ed i range di diluizione pertinenti (per determinare la Minima Concentrazione Inibente, MIC). I risultati devono essere interpretati secondo linee guida specifiche. Seguendo queste indicazioni, si possono ottenere risultati utili per la gestione clinica delle infezioni e per strategie di sorveglianza epidemiologica (ECDC, 2016b).

L'importanza del monitoraggio dell'antibiotico resistenza in patogeni come *Campylobacter* spp. in ambito umano è anche evidenziata tra gli obiettivi del Piano Nazionale di Contrasto all'Antibiotico-Resistenza (PNCAR) 2022-2025 (Abrate et al., 2022).

Se non è possibile testare tutti i ceppi di *Campylobacter* spp. notificati, i test di suscettibilità devono essere condotti su un sottoinsieme rappresentativo di isolati (5-10%), seguendo i metodi descritti dall'ECDC. Questa proporzione dovrebbe variare in base al numero totale di casi. I criteri di selezione devono coprire le caratteristiche dei casi, considerando distribuzione geografica, e stagionale, rappresentatività della popolazione, e indicatori di gravità delle infezioni. È essenziale includere isolati da focolai noti senza sovra rappresentarli nella sorveglianza, garantendo così un'analisi accurata della situazione epidemiologica (European Commission, 2022). Il protocollo, sviluppato dall'ECDC in collaborazione con la rete Food and Waterborne Disease (FWD), supporta il Piano d'Azione della Commissione sulla resistenza agli antimicrobici. Gli obiettivi di sorveglianza per *Campylobacter* spp. negli isolati clinici umani a livello UE sono stati definiti all'interno della rete, portando alla creazione di una lista prioritaria di quattro antimicrobici per *Campylobacter* spp. I laboratori sono quindi incoraggiati a includere un set specifico di antimicrobici prioritari nei test di suscettibilità, ossia la ciprofloxacina, la tetraciclina, l'eritromicina e la gentamicina, in modo da garantire la produzione di dati umani comparabili con quelli prodotti in ossequio alla normativa sovranazionale in animali produttori di alimenti

(Commission Dec.(EU) 2020/1729), ed in generale da alimenti. Altri antibiotici considerati come opzionali nei test da isolati umani sono l'amoxicillina-clavulanico, l'azitromicina, l'ertapenem, il meropenem e l'imipenem (ECDC, 2016a).

Per i test, il metodo di diffusione in agar detto anche test Kirby-Bauer è comunemente utilizzato nei laboratori clinici ed è ancora accettato dall'ECDC e EUCAST (EUCAST, 2025), ma la diluizione in brodo è raccomandata come metodo preferenziale (ECDC, 2016b; EUCAST, 2024). EUCAST supporta anche metodi come le strisce di diffusione a gradiente. Esistono vari metodi commerciali per la determinazione della concentrazione minima inibitoria (MIC), tra cui microdiluzione in brodo, test a gradiente e dispositivi semi-automatizzati. I produttori sono responsabili dell'accuratezza dei sistemi, mentre agli utenti spetta il controllo della qualità nell'esecuzione dei test e degli esiti prodotti.

È importante sottolineare che l'affidabilità dei risultati dipende dalla corretta esecuzione del test, che a sua volta è influenzata da alcuni vincoli tecnici. In particolare, il microrganismo da analizzare deve essere in coltura pura e recente. Inoltre, l'antibiogramma deve essere letto entro i tempi stabiliti e si deve utilizzare una metodologia standardizzata per garantire risultati accurati. I dischetti devono presentare una concentrazione determinata consigliata da EUCAST (ECDC, 2016b), nel caso venga utilizzato il metodo di diffusione in agar, invece, si consiglia di seguire le norme ISO 20776-1:2019 e ISO 20776-2:2021 per la determinazione della MIC, con specifiche per l'intervallo di concentrazioni da testare, per garantire una copertura adeguata dei breakpoint clinici e dei cutoff epidemiologici (ECOFF, ISO 20776-1:2019; ISO 20776-2:2021). Infine, per i dettagli sui metodi di diffusione in agar, si rimanda alla versione 5.0 del protocollo EUCAST (EUCAST, 2015). Per organismi esigenti come *Campylobacter* spp. EUCAST consiglia l'uso di brodo MH-F (brodo MH con sangue di cavallo lisato e beta-NAD) o MH-F agar per la realizzazione dei test di diffusione in agar. È necessario utilizzare un ceppo di riferimento, come il *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* ATCC 33560, noto anche con altre denominazioni (NCTC11351, CCUG 11284, LMG 6444, DSM 4688, JCM 32890, Florent 91 o CIP70.2T) per controllo di qualità e validazione dei risultati (Skerman et al., 1989).

Per la misurazione e interpretazione dell'attività antimicrobica, si consiglia di seguire i breakpoints stabiliti dell'European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (ECDC, 2025). Esistono anche altre organizzazioni internazionali, che garantiscono una robusta analisi dei breakpoint clinici: Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), (EUCAST), Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CASFM).

È cruciale che i laboratori inviino gli isolati e i relativi risultati degli antibiogrammi al LRPTAU. Quest'ultimo, infatti, provvede ad inviare tutti gli isolati di *Campylobacter* spp. vitali al Centro di Referenza Nazionale (CRN) per l'Antibioticoresistenza/National Reference Laboratory for Antimicrobial Resistance (NRL-AR), che ha sede presso l'IZSLT e che effettua i test di suscettibilità a ciprofloxacina (fluorochinoloni), tetraciclina (tetracicline), eritromicina (macrolidi), gentamicina (aminoglicosidi), cloramfenicolo (amfenicoli) ed ertapenem (carbapenemi). I metodi utilizzati per saggiare la sensibilità agli antibiotici sopramenzionati, sono applicati conformemente a quelli descritti dal metodo di riferimento internazionale (norma ISO 20776–1:2019 e ISO 20776–2:2021), per la determinazione della MIC, usando i panels e i range di diluizioni descritti nella decisione europea (UE) 2020/1729. I risultati sono interpretati secondo gli ECOFFs pubblicati da EUCAST, riportati anche nella decisione sopracitata e nel Manuale EFSA aggiornato al 2023. Per gli isolati di origine umana, vengono riportati nei referti del CRN-AR ed NRL-AR i risultati dei test di suscettibilità per le prime 4 molecole. Il LRPTAU invia i risultati raccolti dalle schede e dal CRN/NRL-AR al Coordinamento Enter-Net Italia che validerà e ripeterà gli antibiogrammi nel 10% dei ceppi ricevuti per realizzare un controllo di qualità. Una volta che i dati, sia di MIC che di Kirby Bauer, sono stati controllati, vengono inviati all'ECDC tramite il sistema TESSy. Si inviano risultati quantitativi, facilitando così il confronto nel tempo e con i dati da isolati animali e alimentari, considerando i valori di cut-off epidemiologico. La segnalazione dei risultati interpretati (suscettibile, intermedio, resistente) sarà gradualmente eliminata.

È da sottolineare come il WGS (vedi paragrafo successivo) sia una tecnica promettente come sostituto dei test fenotipici convenzionali di monitoraggio della resistenza agli antimicrobici e venga sempre più utilizzata a livello mondiale. L'uso del WGS può considerarsi un'alternativa alle tecniche fenotipiche convenzionali. Tuttavia devono ancora essere descritte e uniformate tra settore umano e animale le condizioni tecniche per garantire la comparabilità dei dati. L'analisi delle sequenze genomiche ottenute tramite WGS, nel caso dell'utilizzo di strumenti bioinformatici specifici per la ricerca di marcatori di resistenza antibiotica basati su database predefiniti, potrebbe non essere in grado di evidenziare resistenze a antibiotici il cui meccanismo non sia ancora stato identificato e inserito nei rispettivi database di riferimento.

4.5 CARATTERIZZAZIONE DI CEPPI DI *CAMPYLOBACTER* SPP. TRAMITE SEQUENZIAMENTO DI NUOVA GENERAZIONE (NGS)

Gli isolati di *Campylobacter* spp. possono essere sottoposti a caratterizzazione profonda tramite il sequenziamento massivo dell'intero genoma (*Whole Genome Sequencing*) al fine di ricostruire l'intero genoma del ceppo e di identificarne la specie, i geni di resistenza agli antibiotici, i geni di virulenza, la presenza di eventuali plasmidi. Inoltre, tramite l'analisi delle varianti alleliche del ceppo o dei polimorfismi a singolo nucleotide (SNPs), è possibile valutare le correlazioni genetiche rispetto ad altri ceppi. In campo epidemiologico, tale applicazione diviene fondamentale, quindi, per studiare le similitudini tra isolati, i cluster genetici costituiti da isolati da focolai epidemici e da occorrenze non epidemiche, ed eseguire analisi di identificazione della fonte di infezione in corso di indagini per casi di campilobatteriosi. In particolare, per le specie *C. coli* e *C. jejuni*, è possibile identificare il Sequence Type (attraverso Multilocus Sequence Typing, MLST) dato dalla codifica della combinazione allelica di 7 geni housekeeping), il core genome Sequence Type (cgST) (Jolley & Maiden, 2010), la presenza di eventuali plasmidi (es: plasmidFinder, MOB), geni di resistenza agli antibiotici (es: ABRicate, CARD-RGI, ResFinder, AMRFinderPlus), ecc. È importante conoscere la frequenza di aggiornamento dei database nei diversi software e valutare attentamente i risultati ottenuti considerando percentuali di coverage e di omologia. Si consiglia di conservare i dati di sequenza grezzi per un periodo di almeno cinque anni (Statens Serum Institute, 2022).

Il più comune metodo di sequenziamento di nuova generazione usato è quello offerto dalla tecnologia che utilizza l'amplificazione clonale e la chimica di sequenziamento per sintesi (SBS), seguendo i protocolli standard di preparazione delle librerie genomiche che variano in base al kit di sequenziamento usato e alla piattaforma di sequenziamento utilizzata. Durante la fase di preparazione, è necessario stabilire il "coverage" teorico (o profondità di sequenziamento), inteso come il numero di letture che si vogliono ottenere per ogni nucleotide del genoma. Più è elevato il "coverage", maggiore è l'affidabilità del dato ottenuto. Il "coverage" teorico degli isolati viene calcolato in base alla grandezza del genoma del batterio (nel caso di *Campylobacter* spp. circa 1.7 Mbp) e alla capacità di sequenziamento della tecnologia utilizzata. In linea generale il "coverage" richiesto per procedere alle analisi è di almeno 30x (cioè, una media di 30 letture per ogni singolo nucleotide del genoma).

5. METODI DI CONSERVAZIONE DEGLI ISOLATI DI *CAMPYLOBACTER* SPP.

Le metodologie di conservazione e mantenimento degli isolati di *Campylobacter* spp. possono variare in base alla loro destinazione d'uso, che può essere a breve o a lungo termine. La conservazione a breve termine è generalmente associata ad attività di routine, come quelle di diagnostica e ricerca, e trova utilità nei casi in cui è necessario, ad esempio, eseguire diverse prove in più giorni.

Visto che, come già noto da tempo, *Campylobacter* non sopravvive a lungo su terreni solidi, liquidi o semisolidi, e tende a degenerare, nelle colture più vecchie, in forme coccoidi-non mobili e non vitali (Nair et al., 1984; Wang et al., 1980), si raccomanda di mantenere le colonie in condizioni ottimali, subcoltivandole periodicamente su un terreno fresco di mantenimento. Presso i nostri laboratori, ad esempio, conserviamo gli isolati di *Campylobacter* spp. su piastre di Agar Sangue Columbia incubate in condizioni di microaerofila per un massimo di 48-72 h.

La conservazione a lungo termine degli isolati di *Campylobacter* spp. risulta necessaria per scopi di controllo di qualità, di ricerca ed epidemiologici e si può ottenere tramite temperature di congelamento comprese tra -20°C e -80°C (raccomandato), oppure tramite liofilizzazione. Per quanto riguarda il congelamento a lungo termine si raccomanda l'utilizzo di sistemi commerciali costituiti da tubi già dotati di un mezzo di conservazione criogenico e perle di ceramica porose (beads). La temperatura di elezione è rappresentata dai -80°C.

In alternativa ai suddetti sistemi è possibile adottare l'utilizzo di mezzi di conservazione preparati *in-house* la cui formulazione si basa generalmente sulla presenza di brodi nutritivi e glicerolo a diverse percentuali (Gorman & Adley, 2004; Sunarno et al., 2021).

La liofilizzazione è un metodo efficace per conservare i microrganismi. Questa tecnica comporta il trattamento del campione con un agente crioprotettore (es: glicerolo o saccarosio), il congelamento del campione e la successiva rimozione dell'acqua sottovuoto per sublimazione. I campioni liofilizzati devono essere conservati in un luogo fresco e asciutto, di solito a temperature comprese tra i -20°C e -80°C. Se liofilizzati con successo, i microrganismi possono rimanere vitali per molti anni. Tuttavia, gli organismi anaerobi o microaerofili, come *Campylobacter* spp., sono più difficili da liofilizzare a causa della loro sensibilità all'ossigeno. Altri fattori che influiscono sulla vitalità del ceppo liofilizzato, evidenziati in uno studio eseguito nel 2007, sono rappresentati dal tempo di incubazione

della coltura che viene utilizzata, la composizione dell'agente crioprotettore, i tempi e le condizioni di stoccaggio e di re-idratazione (Portner et al., 2007).

Presso il LNR per *Campylobacter* viene utilizzato come agente crioprotettore il siero equino sterile al 5% di mio-inositolo. È tuttavia consigliabile adottare come metodo di riferimento per lo stoccaggio la crioconservazione con i metodi precedentemente descritti, data la maggior stabilità ed omogeneità del materiale conservato nelle Cryobank.

6. TRASPORTO DEGLI ISOLATI BATTERICI

Per il trasporto degli isolati di *Campylobacter* spp. si raccomanda l'utilizzo di piastre di terreno di mantenimento (es: Agar Sangue Columbia) mantenute in buste sigillate o giare, in presenza di bustine generatrici di microaerofilia. In alternativa alle piastre è possibile utilizzare tamponi sterili, disponibili in commercio, con terreno di trasporto AMIES solido e carbone che garantiscono la vitalità del batterio per 4-5 giorni. Si raccomanda di trasportare il materiale a temperatura ambiente.

7. BIBLIOGRAFIA

Abrate, P., Agodi, A., Barbero, R., Bassetti, M., Bortone, G., & et al. (2022). Piano Nazionale di Contrasto all'Antibiotico-Resistenza (PNCAR) 2022-2025. *Ministero Della Salute*, 2022–2025. https://www.salute.gov.it/imgs/C_17_pubblicazioni_3294_allegato.pdf

AMCLI ETS. (2023a). *LINEE DI INDIRIZZO PER L'IMPLEMENTAZIONE E LA GESTIONE DEI PANNELLI SINDROMICI (PaSin)*. U063-2023(3). https://www.amcli.it/wp-content/uploads/2023/03/U063-2023_LINEE-DI-INDIRIZZO-PAN-SIN_REV.pdf

AMCLI ETS. (2023b). Percorso Diagnostico "titolo PD." *Rif. 2023-07, Rev. 2023*, 1–37. https://www.amcli.it/wp-content/uploads/2023/05/07_PD-enteriti-di-origine-infettiva_def25mag2023-2.pdf

APHL association of public health laboratories. (2023). *Campylobacter Isolation and Characterization from Clinical Specimens. Guidance for Public Health Laboratories. September 2023*. <https://www.aphl.org/aboutAPHL/publications/Documents/FS-Campylobacter-Diagnosis-Recommendations.pdf>

- Blaser, M. J., Hardesty, H. L., Powers, B., & Wang, W. L. (1980). Survival of *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* in biological milieus. *Journal of Clinical Microbiology*, *11*(4), 309–313. <https://doi.org/10.1128/jcm.11.4.309-313.1980>
- Bolton, F. J., Surman, S. B., Martin, K., Wareing, D. R. A., & Humphrey, T. J. (1999). Presence of campylobacter and salmonella in sand from bathing beaches. *Epidemiology and Infection*, *122*(1), 7–13. <https://doi.org/10.1017/S0950268898001915>
- Chon, J.-W., Kim, H., Yim, J.-H., Park, J.-H., Kim, M.-S., & Seo, K.-H. (2013). Development of a selective enrichment broth supplemented with bacteriological charcoal and a high concentration of polymyxin B for the detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in chicken carcass rinses. *International Journal of Food Microbiology*, *162*(3), 308–310. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.01.018>
- Davis, L., & DiRita, V. (2008). Growth and Laboratory Maintenance of *Campylobacter jejuni*. *Current Protocols in Microbiology*, *10*(1), 1–7. <https://doi.org/10.1002/9780471729259.mc08a01s10>
- ECDC. (2016a). EU protocol for harmonised monitoring of AMR in human *Salmonella* and *Campylobacter* isolates ANNEX 1 Annex 1. EUCAST clinical breakpoints and epidemiological cut-off values for the priority list of antimicrobials to be tested for. In *Stockholm: ECDC*. <https://doi.org/10.2900/516074>
- ECDC. (2016b). EU protocol for harmonised monitoring of antimicrobial resistance in human *Salmonella* and *Campylobacter* isolates - June 2016. In *Stockholm: ECDC* (Issue June). <https://doi.org/10.2900/516074>
- ECDC. (2025). *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 15*(January 2025). https://www.eucast.org/clinical_breakpoints
- EFSA, & ECDC. (2023). The European Union One Health 2022 Zoonoses Report. In *EFSA Journal* (Vol. 21, Issue 12). <https://doi.org/https://doi.org/10.2903/j.efsa.2023.8442>
- EFSA, & ECDC. (2024). The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans , animals and food in 2021 – 2022. *EFSA Journal*, *22*(2), 1–195. <https://doi.org/https://doi.org/10.2903/j.efsa.2024.8583>

- El Baaboua, A., El Maadoudi, M., Bouyahya, A., Kounoun, A., Bougtaib, H., Omar, B., Boujida, N., & Abrini, J. (2022). a Review of Current Knowledge and Gaps About Campylobacter Methods: From Culture To Characterization. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 11(4), 1–8. <https://doi.org/10.55251/jmbfs.4154>
- EU commission. (2020). Commission Implementing Decision (EU) 2020/1729 of 17 November 2020 on the monitoring and reporting of antimicrobial resistance in zoonotic and commensal bacteria and repealing Implementing Decision 2013/652/EU. *Official Journal of the European Union*, 387(November 2020), 8–21. http://data.europa.eu/eli/dec_impl/2020/1729/oj
- EUCAST. (2015). Antimicrobial susceptibility testing EUCAST disk diffusion method. *Infectioncontrol.Org.Ua*, 5.0(January 2015). www.eucast.org
- EUCAST. (2024). *Reading guide for broth microdilution. Version 5*.(January 2024). https://www.eucast.org/ast_of_bacteria/mic_determination
- EUCAST. (2025). *Disk Diffusion Method for Antimicrobial Susceptibility Testing Antimicrobial susceptibility testing. Version 13*(January 2025). www.eucast.org
- European Commission. (2022). Service contract for the provision of EU networking and support for public health reference laboratory functions for antimicrobial resistance in Salmonella species and Campylobacter species in human samples. SC 2019 74 09. Deliverable T2.4 Model protocol . *Luxembourg: Publications Office of the European Union*, 2021, 4(12). <https://www.fwdamr-reflabcap.eu/-/media/arkiv/projekt-sites/fwdamrreflabcap/resources/reflabcap-protocols-and-guidelines/model-protocol-for-national-surveillance-of-amr-in-human.pdf>
- Ferrari, S., Ástvaldsson, Á., Jernberg, T., Stingl, K., Messelhäuber, U., & Skarin, H. (2023). Validation of PCR methods for confirmation and species identification of thermotolerant Campylobacter as part of EN ISO 10272 - Microbiology of the food chain - Horizontal method for detection and enumeration of Campylobacter spp. *International Journal of Food Microbiology*, 388 (August 2022), 110064. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2022.110064>
- Gazaigne, L., Legrand, P., Renaud, B., Bourra, B., Taillandier, E., Brun-Buisson, C., & Lesprit, P. (2008). Campylobacter fetus bloodstream infection: risk factors and clinical

features. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 27(3), 185–189. <https://doi.org/10.1007/s10096-007-0415-0>

Gharst, G., Oyarzabal, O. A., & Hussain, S. K. (2013). Review of current methodologies to isolate and identify *Campylobacter* spp. from foods. *Journal of Microbiological Methods*, 95(1), 84–92. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2013.07.014>

Goossens, H., De Boeck, M., Van Landuyt, H., & Butzler, J. P. (1984). Isolation of *Campylobacter* *Jejuni* from Human Feces. In *Campylobacter Infection in Man and Animals* (pp. 39–49).

Gorkiewicz, G., Feierl, G., Schober, C., Dieber, F., Köfer, J., Zechner, R., & Zechner, E. L. (2003). Species-Specific Identification of *Campylobacters* by Partial 16S rRNA Gene Sequencing. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(6), 2537–2546. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.6.2537-2546.2003>

Gorman, R., & Adley, C. C. (2004). An evaluation of five preservation techniques and conventional freezing temperatures of -20°C and -85°C for long-term preservation of *Campylobacter jejuni*. *Letters in Applied Microbiology*, 38(4), 306–310. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2004.01490.x>

Hirvonen, J. J., & Kaukoranta, S.-S. (2014). Comparison of FecalSwab and ESwab Devices for Storage and Transportation of Diarrheagenic Bacteria. *Journal of Clinical Microbiology*, 52(7), 2334–2339. <https://doi.org/10.1128/JCM.00539-14>

Hutchinson, D. N., & Bolton, F. J. (1984). Improved blood free selective medium for the isolation of *campylobacter jejuni* from faecal specimens. *Journal of Clinical Pathology*, 37(8), 956–957. <https://doi.org/10.1136/jcp.37.8.956-b>

ISO (International Organization for Standardization). (2021). *ISO 20776-2:2021, Clinical laboratory testing and in vitro diagnostic test systems — Susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices Part 2: Evaluation of performance of antimicrobial*. <https://www.iso.org/standard/79377.html>

ISO (International Organization for Standardization). (2017). *ISO 10272-1:2017, Microbiology of the food chain — Horizontal method for detection and enumeration of *Campylobacter* spp. — Part 1: Detection method*.

<https://www.iso.org/standard/63225.html>

ISO (International Organization for Standardization). (2023). *ISO 10272-2:2017/Amd 1:2023, Microbiology of the food chain — Horizontal method for detection and enumeration of Campylobacter spp. — Part 2: Colony-count technique — Amendment 1: Inclusion of methods for molecular confirmation and identification of ther.* <https://www.iso.org/standard/77640.html>

ISO (International Organization for Standardization). (2019). *ISO 20776-1:2019, Susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices Part 1: Broth micro-dilution reference method for testing the in vitro activity of antimicrobial agents against rapidly.* <https://www.iso.org/standard/70464.html>

Joensen, K. G., Kiil, K., Gantzhorn, M. R., Nauerby, B., Engberg, J., Holt, H. M., Nielsen, H. L., Petersen, A. M., Kuhn, K. G., Sandø, G., Ethelberg, S., & Nielsen, E. M. (2020). Whole-Genome Sequencing to Detect Numerous *Campylobacter jejuni* Outbreaks and Match Patient Isolates to Sources, Denmark, 2015–2017. *Emerging Infectious Diseases*, 26(3), 523–532. <https://doi.org/10.3201/eid2603.190947>

Jolley, K. A., & Maiden, M. C. (2010). BIGSdb: Scalable analysis of bacterial genome variation at the population level. *BMC Bioinformatics*, 11(1), 595. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-11-595>

Kim, J., Oh, E., Banting, G. S., Braithwaite, S., Chui, L., Ashbolt, N. J., Neumann, N. F., & Jeon, B. (2016). An Improved Culture Method for Selective Isolation of *Campylobacter jejuni* from Wastewater. *Frontiers in Microbiology*, 7(AUG). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01345>

Louwen, R., van Baarlen, P., van Vliet, A.H., van Belkum, A., Hays, J.P., Endtz, H.P. *Campylobacter bacteremia: a rare and under-reported event?* *Eur J Microbiol Immunol (Bp)*. 2012 Mar;2(1):76-87. doi: 10.1556/EuJMI.2.2012.1.11. Epub 2012 Mar 17.

Lucarelli, C., Garcia-Fernandez, A., Dionisi, A. M., Owczarek, S., Arena, S., Fortini, D., Errico, G., Maraglino, F., Pilati, S., Palamara, A. T., & Villa, L. (2024). Sorveglianza nazionale delle infezioni da *Salmonella*, *Campylobacter*, *Shigella* e *Yersinia*. Dati Enter-Net Italia 2016-2021. *Rapporti ISS Sorveglianza RIS-1/2024*, iii, 33 p.

- Luzzi, I., Garc, A., Dionisi, A. M., Lucarelli, C., Gattuso, A., Gianfranceschi, M., Maugliani, A., Caprioli, A., Morabito, S., & Scavia, G. (2017). *Enter-Net Italia e Registro Italiano Della Sindrome Emolitico Uremica: Sorveglianza Delle Infezioni Da Salmonella, Campylobacter, Escherichia Coli Produttore Di Shiga-Tossina e Listeria Monocytogenes (2010–2015)*. Rapporti ISTISAN 17/34.
- Maher, M., Finnegan, C., Collins, E., Ward, B., Carroll, C., & Cormican, M. (2003). Evaluation of Culture Methods and a DNA Probe-Based PCR Assay for Detection of Campylobacter Species in Clinical Specimens of Feces. *Journal of Clinical Microbiology*, *41*(7), 2980–2986. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.7.2980-2986.2003>
- Mughini-Gras, L., Pijnacker, R., Coipan, C., Mulder, A. C., Fernandes Veludo, A., de Rijk, S., van Hoek, A. H. A. M., Buij, R., Muskens, G., Koene, M., Veldman, K., Duim, B., van der Graaf-van Bloois, L., van der Weijden, C., Kuiling, S., Verbruggen, A., van der Giessen, J., Opsteegh, M., van der Voort, M., ... Franz, E. (2021). Sources and transmission routes of campylobacteriosis: A combined analysis of genome and exposure data. *Journal of Infection*, *82*(2), 216–226. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2020.09.039>
- Nair, G. B., Chowdhury, S., Das, P., Pal, S., & Pal, S. C. (1984). Improved preservation medium for Campylobacter jejuni. *Journal of Clinical Microbiology*, *19*(2), 298–299. <https://doi.org/10.1128/jcm.19.2.298-299.1984>
- Portner, D. C., Leuschner, R. G. K., & Murray, B. S. (2007). Optimising the viability during storage of freeze-dried cell preparations of Campylobacter jejuni. *Cryobiology*, *54*(3), 265–270. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2007.03.002>
- Salim, S. M., Mandal, J., & Parija, S. C. (2014). Isolation of Campylobacter from human stool samples. *Indian Journal of Medical Microbiology*, *32*(1), 35–38. <https://doi.org/10.4103/0255-0857.124294>
- Samosornsuk, W., Asakura, M., Yoshida, E., Taguchi, T., Eampokalap, B., Chaicumpa, W., & Yamasaki, S. (2015). Isolation and Characterization of *Campylobacter* Strains from Diarrheal Patients in Central and Suburban Bangkok, Thailand. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, *68*(3), 209–215. <https://doi.org/10.7883/yoken.JJID.2014.229>
- Scallan, E., Hoekstra, R. M., Mahon, B. E., Jones, T. F., & Griffin, P. M. (2015). An

assessment of the human health impact of seven leading foodborne pathogens in the United States using disability adjusted life years. *Epidemiology and Infection*, 143(13), 2795–2804. <https://doi.org/10.1017/S0950268814003185>

Seliwiorstow, T., Baré, J., Verhaegen, B., Uyttendaele, M., & De Zutter, L. (2014). Evaluation of a new chromogenic medium for direct enumeration of *Campylobacter* in poultry meat samples. *Journal of Food Protection*, 77(12), 2111–2114. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-14-237>

Skerman, V., McGowan, V., & Sneath, P. H. A. (1989). Approved Lists of Bacterial Names (Amended). *American Society for Microbiology*, 30(1), 72. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK814/>

Skirrow, M. B. (1977). *Campylobacter* enteritis: a “new” disease. *BMJ*, 2(6078), 9–11. <https://doi.org/10.1136/bmj.2.6078.9>

Statens Serum Institute, D. (FWD A.-R. (2022). *Proposed protocol for whole genome sequencing based analysis for detection and tracing of epidemic clones of antimicrobial resistant Salmonella and Campylobacter - to be used for national surveillance and integrated outbreak investigations by NRLs for pub.* <https://www.fwdamr-reflabcap.eu/-/media/arkiv/projekt-sites/fwdamrreflabcap/resources/protocols-and-guidelines/fwd-amr-reflabcap-wgs-protocol-8-july-2022.pdf>

Sunarno, Nursofiah, S., Hartoyo, Y., Amalia, N., Febrianti, T., Febriyana, D., Saraswati, R. D., Puspandari, N., Sariadji, K., Khariri, Rukminiati, Y., Muna, F., Susanti, I., & Multihartina, P. (2021). Long-term Storage of Bacterial Isolates by Using Tryptic Soy Broth with 15% Glycerol in The Deep Freezer (-70 to -80 °C). *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 913(1), 012070. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/913/1/012070>

Talbi, M., Abdeljelil, M., Marzouk, M., Ben Fradj, F., Ben Salem, Y., & Boukadida, J. (2021). *Campylobacter fetus* Meningitis: A diagnosis to suggest in immunocompromised patients. *IDCases*, 26, e01249. <https://doi.org/10.1016/j.idcr.2021.e01249>

Wang, W. L. L., Luechtefeld, N. W., Reller, L. B., & Blaser, M. J. (1980). Enriched brucella medium for storage and transport of cultures of *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni*. *Journal of Clinical Microbiology*, 12(3), 479–480. <https://doi.org/10.1128/jcm.12.3.479->

480.1980

- Wang, W. L. L., Reller, L. B., Smallwood, B., Luechtefeld, N. W., & Blaser, M. J. (1983). Evaluation of transport media for *Campylobacter jejuni* in human fecal specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, *18*(4), 803–807. <https://doi.org/10.1128/jcm.18.4.803-807.1983>
- Yamazaki-Matsune, W., Taguchi, M., Seto, K., Kawahara, R., Kawatsu, K., Kumeda, Y., Kitazato, M., Nukina, M., Misawa, N., & Tsukamoto, T. (2007). Development of a multiplex PCR assay for identification of *Campylobacter coli*, *Campylobacter fetus*, *Campylobacter hyointestinalis* subsp. *hyointestinalis*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter lari* and *Campylobacter upsaliensis*. *Journal of Medical Microbiology*, *56*(11), 1467–1473. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.47363-0>