

Prevalenza di *Staphylococcus aureus* e dei suoi biotipi nell'allevamento del coniglio

**Agnoletti F., Bano L., Cocchi M., Deotto S., Drigo I., Guolo A., Marcon B.,
Mazzolini E.**

Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Italy

Corresponding Author: Fabrizio Agnoletti, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie. Viale Brigata Treviso 13/a, 31100 Treviso, Italy - Tel. +39 0422 302302 - Fax: +39 0422 421154 - Email: fagnoletti@izsvenezie.it

ABSTRACT: *Staphylococcus aureus* and biotypes prevalence in rabbit herd breeding. A cross sectional study with a two-stage sampling was undertaken to estimate *Staphylococcus aureus* prevalence in intensive rabbitries. Eleven herd were selected and 60 does were systematically sampled inside reproductive units. Nose, ear, abdomen and interdigital skin swabs were collected from 660 does and data about productive and health herd parameters were interviewed. In 6 herds a quantitative and qualitative evaluation of lesions referred to staphylococcosis was associated to individual sampling. Results evidenced an inside herd mean prevalence of 81% (95%CI 78% – 84%). No statistically significant association was found between *Staphylococcus aureus* or his biotypes prevalence with productive parameters and lesions; the possibility that test and culling may affect the latter association is considered, while an information biases was suggested for the former lack of association. The possibility that the study design reduces power and affects results was also emphasized.

Key words: *Staphylococcus aureus*, Rabbit, Biotype.

INTRODUZIONE – La necessità di tutelare la salute pubblica attraverso un minor utilizzo di farmaci antimicrobici e, contestualmente, di contenere i costi di produzione della carne di coniglio, condizionano la gestione sanitaria degli allevamenti e giustificano il tentativo di creare gruppi di animali esenti da determinati patogeni. L'esistenza di ceppi HV-SA (High Virulence *Staphylococcus aureus*) è nota da tempo (Devriese *et al.*, 1981), e l'attuazione del vuoto sanitario rappresenta spesso l'unica possibilità di risanamento delle aziende infette (Hermans *et al.*, 2003). I ceppi HV-SA costituiscono, quindi, un candidato ideale per una politica di eradicazione, già attuata da alcune aziende europee. Queste azioni mirano, inoltre, alla creazione di plus valore commerciale e ad ottimizzare le produzioni di soggetti altamente selezionati. Per poter estendere e migliorare i programmi di controllo mirati alla creazione di gruppi esenti da HV-SA, tuttavia, è necessario consolidare le conoscenze sull'epidemiologia della stafilococcosi nella realtà produttiva italiana. Il presente lavoro si propone di offrire un contributo di informazioni, per una miglior comprensione di questo tema attraverso una stima della prevalenza di *Staphylococcus aureus* (SA) e dei suoi biotipi all'interno dei reparti di maternità, e la correlazione fra la situazione sanitaria e produttiva dell'allevamento con i biotipi presenti.

MATERIALI E METODI – L'indagine ha coinvolto 11 allevamenti di conigli, in ciascuno dei quali venivano selezionati, mediante campionamento sistematico con scelta randomizzata del campione di partenza, 60 riproduttori, che venivano sottoposti a

ricerca di SA. Il prelievo dei campioni, il successivo isolamento e l'identificazione di SA, avvenivano secondo il protocollo descritto da Agnoletti *et al.* (2007). Ai fini dell'identificazione del biotipo, determinato secondo il protocollo descritto da Devriese (Devriese *et al.*, 1981), veniva utilizzata una singola colonia di SA per ciascun animale positivo. In 6 allevamenti, inoltre, da ciascun individuo si procedeva alla registrazione delle lesioni riferibili a stafilococchi, individuandone sia la localizzazione che la gravità opportunamente categorizzate. Infine, per ogni allevamento, si procedeva alla raccolta di informazioni relative alla gestione tecnica: numero medio di parti delle fattrici, tasso annuale di rimonta, numero medio di coniglietti svezzati per fattrice, origine genetica dei riproduttori, e l'anamnesi sanitaria. L'analisi statistica utilizzava il test Chi quadrato per evidenziare possibili associazioni tra variabili, per il calcolo dell'errore di primo tipo è stato considerato il peso del campionamento a doppio stadio.

RISULTATI E DISCUSSIONE – In tutti gli allevamenti esaminati è stato isolato SA, la cui prevalenza, nell'ambito di ciascun allevamento, era compresa fra il 46 ed il 95%, con una media dell'81% (95%CI 78% – 84%) (Tabella 1). I valori di prevalenza da noi osservati appaiono analoghi a quanto segnalato da altri autori (Hermans *et al.*, 1999), sebbene non siano state osservate differenze statisticamente significative ($p=0.5795$) nella prevalenza di SA fra allevamenti con differente situazione sanitaria, come invece riportato da Hermans *et al.* (1999). La ridotta prevalenza di SA evidenziata nell'allevamento n° 3 (53%) potrebbe essere imputabile alla presenza di un impianto automatico che nebulizza disinfettante battericida in più cicli giornalieri, mentre per l'allevamento n. 11, la limitata prevalenza (46,6%) può riferirsi ad una situazione igienico sanitaria ottimale. Per quanto attiene ai risultati della biotipizzazione sono stati evidenziati due biotipi: l'umano ed il Mixed CV-C. In 9/11 allevamenti è stato evidenziato un unico biotipo, mentre in un'ulteriore azienda (n. 9) un biotipo prevaleva nettamente sull'altro. L'isolamento del solo biotipo umano in 4 allevamenti con la medesima origine genetica delle fattrici, potrebbe trovare spiegazioni nella selezione negativa nei confronti di SA biotipo Mixed CV-C, attuata da alcune aziende che forniscono riproduttori; invece l'isolamento del solo biotipo Mixed CV-C in 5 allevamenti, potrebbe trovare giustificazione nell'origine clonale dei ceppi. La presenza di adesine di superficie (MSCRAMMs) in grado di amplificare la contagiosità dell'infezione (Vancraeynest *et al.*, 2004), infatti, caratterizza i ceppi HV-SA appartenenti al biotipo Mixed CV-C. E' evidente, tuttavia, che per verificare questo aspetto sarà necessario fare ricorso a metodi di laboratorio che considerino il grado di omologia genetica più che le differenze fenotipiche degli isolati. Due allevamenti esaminati (n. 2 e 3) erano in procinto di attuare il vuoto sanitario a causa di problematiche di stafilococchi che ne avevano compromesso la redditività; in entrambi è stato isolato il biotipo Mixed CV-C, rispettivamente nel 100% e nel 40,3% degli isolati. Nelle aziende n° 6 ed 11, invece, a fronte di una situazione produttiva ottimale, il 100% degli isolati apparteneva al biotipo Mixed CV-C, con una prevalenza, rispettivamente, dell'83,3% e del 46,6%. Questi dati erano in apparente contraddizione con i precedenti riscontri, tuttavia successive analisi eseguite nel nostro laboratorio (dati non pubblicati), hanno evidenziato in questi ceppi l'assenza dei marker genetici che sembrano caratterizzare i ceppi HV-SA (Vancraeynest *et al.*, 2007). I ceppi isolati dall'allevamento n. 6 e nel n. 11, accumulati dalla medesima origine genetica dei riproduttori, potrebbero rappresentare un esempio documentato di ceppi LV-SA appartenenti al biotipo Mixed CV-C. In 6 allevamenti, (360 conigli) sono state raccolte

informazioni anche circa la presenza di lesioni: piaghe podali, mastiti, ascessi cutanei. L'analisi statistica non ha permesso di evidenziare correlazioni tra la presenza di lesioni ($p=0.2154$) o la loro gravità ($p=0.5892$) ed il biotipo di SA. Questo dato, apparentemente incongruente, è probabilmente condizionato dall'azione di selezione attuata dall'allevatore, con la quale vengono sottratti all'osservazione i casi di stafilococcosi conclamata. Anche l'analisi di alcuni parametri produttivi, inserita per cercare di ovviare a questo problema, non ha messo in evidenza associazioni statisticamente significative con la prevalenza di un determinato biotipo. Infatti, tenendo in considerazione il disegno dello studio, con il campionamento a due stadi e quindi il clustering dovuto alla selezione degli allevamenti come unità epidemiologica primaria, per gli 11 allevamenti e 660 conigli, non si osservano associazioni significative tra i biotipi isolati ed il numero medio di parti ($p=0.1516$), il numero medio di conigli svezzati ($p=0.3313$), la percentuale di rimonta annuale ($p=0.3130$) e l'anamnesi sanitaria ($p=0.1147$); va tuttavia precisato che in questo progetto il disegno dello studio incide molto sulla potenza dello studio stesso e che un ulteriore campionamento, peraltro in corso, potrebbe modificare queste conclusioni. Riteniamo, inoltre, che questo riscontro possa essere condizionato, dalla particolare difficoltà nella raccolta di parametri produttivi attendibili in situazioni di campo, e che pertanto vi possano essere dei bias di informazione. Da questo studio, infine, emerge la necessità di migliorare i metodi di indagine per la caratterizzazione di SA; questo tipo di ricerca dovrà probabilmente basarsi su metodi biomolecolari, caratterizzati da maggiore sensibilità e specificità rispetto allo studio dei caratteri fenotipici attualmente adottato.

Tabella 1. Prevalenza percentuale di *Staphylococcus aureus* (SA) e dei suoi biotipi

Allevamento	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
Anamnesi*	0	3	3	0	0	0	0	1	1	2	0	
% Prevalenza	S. aureus	93,3	95	53,3	90	83,3	83,3	93,3	91,6	85	80	46,6
	Biotipo Umano	100	50,9	0	98,1	98	0	98,2	0	9,8	0	0
	Biot. Mixed CV-C	0	40,3	100	0	0	100	0	78,2	78,4	100	100

*0: stafilococcosi assente; 1-2-3: stafilococcosi sporadica, media e grave

BIBLIOGRAFIA – **Agnoletti**, F., Bano, L., Cocchi, M., Ferro, T., Marcon, B., Mazzolini, E. 2007. Valutazione della sensibilità del sito di prelievo per la ricerca di conigli portatori di *Staphylococcus aureus* mediante esame colturale. Convegno nazionale ASIC, Forlì. **Devriese**, L.A., Godard, C., Okerman, L., Renault, L. 1981. Characteristics of *Staphylococcus aureus* strains from rabbits. Ann.Rech.Vét., 12 (3),327-332. **Hermans**, K., De Herdt, P., Devriese, L.A., Hendrickx, W., Godard, C., Haesebrouck, F. 1999. Colonization of rabbits with *Staphylococcus aureus* in flocks with and without chronic staphylococcosis. Vet. Microbiol., 67:37-46. **Hermans**, K., Devriese, L.A., Haesebrouck, F. 2003. Rabbit staphylococcosis: difficult solutions for serious problems. Vet. Microbiol., 91:57-64. **Vancraeynest**, D., Hermans, K., Haesebrouck, F., 2004. Genotypic and phenotypic screening of high and low virulence *Staphylococcus aureus* isolates from rabbits for biofilm formation and MSCRAMMs. Vet. Microbiol. 103: 241-247. **Vancraeynest**, D., Haesebrouck, F., Hermans, K. 2007. Multiplex PCR assay for the detection of high virulence rabbit *Staphylococcus aureus* strains. Vet. Microbiol. 121: 368-372.