

Valutazione della sensibilità del sito di prelievo per la ricerca di conigli portatori di *Staphylococcus aureus* mediante esame culturale

Agnoletti F., Bano L., Cocchi M., Ferro T., 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: Sensibility evaluation of sampled anatomical site to detect *Staphylococcus aureus* carriers by culture method. Staphylococcosis can be considered a target of eradication in industrial rabbitries, as it is a widespread disease, it causes severe illness in the reproductive units and, at the present, there are no effective vaccines developed while antibiotic treatments should be avoided whenever possible. To eradicate the disease it is necessary to recognize contaminated or infected rabbits with high virulent *Staphylococcus aureus*. Being at the present no other systems available but the cultural method, an estimation of the sensibility of a screening system based on swabs scraping from four anatomical rabbits sites was investigated. Results pointed out that an association of ear, inter-digital and abdomen cute scraping can achieve a sensibility of 95% (85-100%, 95%CI). Bacterial contamination of samples can reduce sensibility but further studies are ongoing to understand the amount of such interference.

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

INTRODUZIONE – La diffusione dei fenomeni di farmacoresistenza batterica e la scarsa propensione dell'industria farmaceutica allo sviluppo di nuove molecole destinate a comparti zootecnici a valenza locale, fra i quali la coniglicoltura, rappresentano fattori destinati a condizionare in misura crescente la gestione sanitaria dell'allevamento del coniglio, nel quale, in analogia ad altri settori, si sta diffondendo una tendenza ad ottimizzare e ridurre l'impiego del farmaco. Dal punto di vista della gestione sanitaria ciò significa, quando possibile, puntare alla creazione di gruppi esenti da patogeni responsabili di danni sanitari importanti e causa di un utilizzo eccessivo di farmaci antimicrobici. Già da alcuni anni riscontri di campo, successivamente confermati mediante attività di ricerca, hanno suggerito l'esistenza di ceppi di *S. aureus* con diversa patogenicità (Devriese *et al.*, 1981). In particolare esistono ceppi a bassa ed alta virulenza (LV-SA ed HV-SA: low virulence ed high virulence *Staphylococcus aureus*), che differiscono non tanto nella capacità di creare lesioni nel singolo animale quanto nella capacità diffusiva in azienda e, di conseguenza, nell'impatto economico della patologia da essi determinata (Hermans *et al.*, 1999). Alcuni autori ritengono che in allevamenti infetti da ceppi HV-SA sia inevitabile l'attuazione del vuoto sanitario (Hermans *et al.*, 2003). I ceppi HV-SA rappresenterebbero, quindi, un obiettivo ideale per una politica di eradicazione. Le attuali difficoltà nella realizzazione di questo progetto risiedono nel fatto che, per l'individuazione dei soggetti portatori, mancano strumenti di diagnosi sierologica, generalmente utilizzati nei piani di controllo/eradicazione; ciò è dovuto al fatto che i vari sierotipi di *S. aureus* non

producono risposte immunitarie umorali che ci permettano di distinguere soggetti HV + da quelli LV + e, nel contempo, alla diffusione elevata dei ceppi LV. Attualmente, dunque, la creazione di gruppi di conigli esenti da ceppi HV-SA è basata sull'utilizzo di metodi batteriologici tradizionali, mirati ad individuare i soggetti portatori sani, principali fattori di rischio nell'introduzione dell'infezione. Si rende così necessaria la messa a punto e la standardizzazione di protocolli per la ricerca di conigli portatori di *S. aureus* mediante isolamento ed identificazione del microrganismo, che tengano conto della fattibilità tecnica ed economica di quanto proposto. E' comunemente accettato il fatto che *S. aureus* rappresenti un normale contaminante del pelo e della cute di coniglio; i pochi studi effettuati al riguardo evidenziano prevalenze variabili dallo 0 al 100 % (Hermans *et al.*, 1999); le percentuali di isolamento sono condizionate dal numero dei siti di prelievo cutanei campionati per ciascun animale ((Hermans *et al.*, 1999). Il presente lavoro vuole verificare i dati precedentemente illustrati e si propone di porre le basi per la definizione di un protocollo tecnico per la ricerca di conigli portatori di HV-SA mediante metodo colturale. E' stata valutata la sensibilità di un protocollo diagnostico che prevede il campionamento in uno o più siti anatomici e la successiva analisi microbiologica. E' stata analizzata, quindi, la capacità di identificare correttamente i soggetti portatori di *S. aureus* in una situazione di campo, in cui variabili diverse contribuiscono al risultato finale; fra queste il tipo ed il numero di siti anatomici campionati e l'efficienza del terreno di coltura nel supportare la crescita di *S. aureus* in presenza di altri contaminanti.

MATERIALI E METODI – Sessantadue conigli clinicamente sani, di età superiore ai 40 gg, provenienti da 35 diversi allevamenti, sono stati sottoposti a ricerca di *S. aureus* dalla cute. Il prelievo veniva effettuato mediante tamponi cotonati sterili previamente inumiditi in HIB (Heart Infusion Broth, Difco), strofinati sulla faccia interna del padiglione auricolare (P), sull'addome (A), nello spazio interdigitale della zampa posteriore (D) ed in cavità nasale (N). Per il prelievo nasale venivano utilizzati tamponi di tipo pediatrico con ansa metallica, introdotti in cavità nasale per circa 1 cm di profondità. Dopo il prelievo l'estremità cotonata del tampone veniva inserita in una provetta di HIB (5 ml) incubata a 37°C ±1°C per 24 h. Al termine dell'incubazione 30 µl di brodocoltura venivano seminati in una piastra di BP (Baird-Parker, Oxoid) incubata a 37°C ±1°C per 24-48 h. Al termine dell'incubazione veniva registrata la presenza di colonie con morfologia riferibile a *S. aureus*. Veniva registrato, inoltre, il grado di purezza o di contaminazione degli isolati ed il numero di colonie di *S. aureus* osservate, al fine di valutare l'eventuale riduzione di sensibilità dell'isolamento ad opera dell'interferenza negativa da parte di inquinanti batterici. La contaminazione delle piastre di BP, infatti, incide sulla capacità del terreno di coltura di supportare la crescita di *S. aureus* e sulla capacità dell'operatore di individuarne le colonie. In caso di dubbio, comunque, le colonie sospette venivano reisolte su terreno Columbia Agar addizionato di globuli rossi di montone (5% v/v) e identificate mediante le normali procedure biochimiche. Per l'analisi dei dati è stato considerato "vero positivo" il coniglio che presentava almeno un campionamento positivo, indipendentemente dalla quantità di colonie rinvenute. Veniva considerato "vero negativo" il coniglio che risultava negativo a tutti i 4 campionamenti. Veniva quindi calcolata la sensibilità per ogni tipo di prelievo e per le diverse combinazioni di questi. Era inoltre analizzata la correlazione tra l'isolamento di *S. aureus* e la contaminazione delle piastre; per l'analisi del significato statistico della correlazione veniva impiegato il test Chi². Il metodo colturale con

identificazione biochimica di *S. aureus* mediante micrometodo API Staph (BioMerieux) è stato considerato il golden test e ciò presuppone che la sua specificità sia del 100%.

RISULTATI E CONCLUSIONI – Il protocollo da noi utilizzato ha permesso di isolare *S. aureus* dal 70 % dei conigli conferiti; questo dato risulta confortante rispetto a quanto ottenuto da Hermas *et al.* (1999), che riferiva l'isolamento di *S. aureus* dal 60% dei conigli esaminati, campionati però in 10 diversi siti corporei. Si individuavano pertanto 43 conigli veri positivi e 19 conigli veri negativi. Quattro conigli risultavano positivi solo al campione P, 6 solo al campione A, 2 solo al campione D e 2 solo al campione N. Il prelievo nasale risulta ovviamente il più indaginoso fra i 4 siti corporei considerati, per la naturale tendenza dell'animale a serrare la narice al momento dell'inserimento del tampone. In tabella 1 sono indicati i valori di sensibilità ottenuti dall'applicazione del protocollo per la ricerca dei conigli portatori di SA. La sensibilità varia dal 55,8 al 100% a seconda delle diverse combinazioni dei siti anatomici di prelievo utilizzati. A questo proposito è interessante osservare come l'adozione della combinazione P+A+D permetta di raggiungere una sensibilità elevata (95%) e potrebbe rappresentare una valida proposta per l'applicazione pratica di programmi di controllo dei ceppi HV-SA. Infine è stata rilevata un'importante correlazione tra la contaminazione del campione e la possibilità di isolare *S. aureus*; è possibile, cioè, che la contaminazione dei campioni riduca la sensibilità del metodo e possa produrre dei falsi negativi, tuttavia a causa del ridotto campionamento tra i diversi strati della contaminazione, il trend osservato non può escludere l'ipotesi nulla; sarà pertanto motivo di un ulteriore progetto aumentare la potenza dello studio mediante un campionamento più ampio.

Tabella 1: Sensibilità del protocollo di ricerca dei conigli portatori di *S. aureus*.
P: padiglione auricolare; A: addome; D: spazio interdigitale; N: naso.

Campione	N. veri +	N. falsi -	sensibilità	Sensibilità: 95% CI: limite	
				basso	Alto
P	33	10	76,7	64,1	89,3
A	27	16	62,8	48,3	77,2
D	24	19	55,8	41	70,7
N	26	17	60,5	45,9	75,1
P+A	39	4	90,7	82	99,4
P+D	35	8	81,4	70	93
P+N	35	8	81,4	70	93
P+A+D	41	2	95,3	89	100
P+A+N	31	6	86,0	72	95,7
P+A+D+N	43	0	100,0	100	100

BIBLIOGRAFIA – 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.