

Impiego della PFGE per lo studio dell'epidemiologia delle infezioni da *Staphylococcus aureus* nel coniglio

Drigo I., Bacchin C., Amato S., Bano L., Bonci M., Dalla Pozza M.C., Deotto S., Ferro T., Guolo A., Marcon B., Agnoletti F.

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: Use of PFGE to study the epidemiology of *Staphylococcus aureus* infections in rabbit. To estimate the role of 13 *Staphylococcus aureus* virulence genes (*bbp*, *cna*, *fnb A*, *fnb B*, *fib*, *clf A*, *clf B*, *ebp S*, *eno*, *bap*, *ica A*, *ica D*, *selm*) and of the *flank* DNA sequence, 72 *S. aureus* strains originating from 8 rabbit farms of known staphylococcosis anamnesis were genotyped by PFGE and PCR. Results were related with the biotype, the commercial source of breeders and the staphylococcosis anamnesis. *S. aureus* isolates were classified in 5 different PFGE clusters: cluster A and D contained strains belonging to mixed CV-C biotype isolated from farms without staphylococcosis; cluster B and E contained strains belonging to mixed CV-C biotype isolated from farms with heavy staphylococcosis; cluster C contained humans biotypes isolated from farms without clinical problems. In farms affected by heavy staphylococcosis two different virulence genes profiles were detected: *bbp- flank- cna+ fnbB-* in the cluster B and *bbp+ flank+ cna+ fnbB-* in the cluster E.

Key words: *Staphylococcus aureus*, Rabbit, Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE).

INTRODUZIONE – Precedenti indagini sulla stafilococcosi del coniglio hanno evidenziato che all'interno del singolo allevamento gli isolati batterici appartengono ad un unico biotipo o ad un biotipo nettamente prevalente (Agnoletti *et al.*, 2008), facendone ipotizzare la natura clonale. La clonalità degli isolati di *S. aureus* può essere studiata ricorrendo a diversi metodi di fingerprint genetico; tra questi, la pulsed field gel electrophoresis (PFGE), grazie all'elevato potere discriminatorio, è considerata il golden standard. Secondo Vancraeynest *et al.* (2006, 2007) i ceppi di *S. aureus* ad elevata virulenza hanno una natura clonale e sono caratterizzati dal profilo genetico *bbp+selm+flank+*, tuttavia, i risultati di una nostra precedente indagine (Agnoletti *et al.*, 2009) non confermano quest'ipotesi. Infatti, la circolazione in allevamenti colpiti da gravi forme di stafilococcosi di ceppi di *S. aureus* con caratteristiche genetiche diverse da quelle indicate come tipiche dei ceppi ad alta virulenza, sottolinea l'opportunità di ulteriori indagini. La necessità di applicare strategie di eradicazione piuttosto che terapeutiche per i ceppi ipervirulenti di *S. aureus* esige, inoltre, uno strumento che caratterizzi univocamente i ceppi di *S. aureus*. Obiettivo del nostro lavoro è determinare il profilo genetico dei ceppi di *S. aureus* isolati in allevamenti interessati da stafilococcosi di diversa gravità, al fine di verificare l'ipotesi di clonalità dei ceppi ad elevata virulenza.

MATERIALI E METODI – Per l'esecuzione di questa indagine sono stati utilizzati 72 ceppi di *S. aureus* isolati da 8 allevamenti nell'ambito di un precedente studio (Agnoletti *et al.*, 2008), durante il quale erano state raccolte informazioni sulla presenza ed eventuale

gravità della stafilococcosi. L'anamnesi è stata classificata con un punteggio da 0 a 3 (stafilococcosi assente, sporadica, media o grave). Tutti i ceppi, identificati con tradizionali metodi fenotipici e mediante PCR (Martineau *et al.*, 1998), sono stati biotipizzati (Devriese *et al.*, 1981) e quindi sottoposti a PCR per la ricerca della sequenza *flank* e di un pannello di 13 geni codificanti fattori di virulenza (*bbp*, *cna*, *fnb A*, *fnb B*, *fib*, *clf A*, *clf B*, *ebp S*, *eno*, *bap*, *selm*, *ica A*, *ica D*). Successivamente i ceppi sono stati analizzati mediante PFGE e suddivisi in cluster in base alla loro omologia genetica. **Estrazione del DNA da isolati batterici.** Il DNA è stato estratto utilizzando il kit commerciale DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen) seguendo le istruzioni fornite dal produttore. **PCR.** Per l'amplificazione dei 13 geni e della sequenza *flank* sono stati utilizzati i primer suggeriti da Vancraeynest *et al.* (2004; 2007). **PFGE.** Il DNA genomico è stato estratto secondo quanto descritto da Cookson *et al.* (2007) e O'Brien *et al.* (2007) con alcune modifiche. Per la preparazione delle plugs è stato utilizzato il SeaKem Gold Agarose (Biospa) all'1% addizionato di 0,4 µg/µl di lisostafina, e dopo una prima lisi a 37 °C per 4 h è stata effettuata una seconda lisi a 50°C per 24 h in buffer contenente 2 mg/ml di proteinasi K. Il DNA totale è stato successivamente tagliato utilizzando l'enzima *SmaI* (Roche). In ciascuna corsa è stato utilizzato come controllo di processo il ceppo di riferimento di *S. aureus* NCTC 8325. I fingerprint patterns sono stati analizzati utilizzando una tolleranza ed un'ottimizzazione del 2% e per la definizione di cluster è stato utilizzato un cut off di similitudine dell'80%.

RISULTATI E CONCLUSIONI – L'analisi mediante PFGE dei ceppi di *S. aureus* ha permesso di individuare cinque diversi cluster (tabella 1) che sembrano legati sia all'allevamento di origine sia alla provenienza commerciale degli animali. In particolare, *S. aureus* provenienti dal medesimo allevamento ed appartenenti al medesimo biotipo ricadono generalmente nello stesso cluster. Ciò suggerisce che all'interno del singolo allevamento i ceppi batterici dominanti possano avere origine clonale, ciò in accordo con l'osservazione di Agnoletti *et al.* (2008) per cui all'interno di ogni allevamento esiste solitamente un unico biotipo oppure un biotipo prevalente. Al tempo stesso, tuttavia, il cluster rilevato in allevamento sembra condizionato dall'origine commerciale degli animali, infatti tutti i ceppi appartenenti al biotipo umano, isolati in 4 allevamenti diversi ma accomunati dalla medesima origine commerciale dei riproduttori, sono risultati appartenere al medesimo cluster. Ciò significa che nell'allevamento da ingrasso saranno presenti gli stafilococchi tipici del centro di moltiplicazione dal quale sono stati acquistati i riproduttori, tenendo però presente che esistono anche altre possibilità di introduzione di stafilococchi patogeni. Il biotipo umano, nel quale sono compresi ceppi a limitata virulenza per il coniglio, sembra caratterizzato da limitata variabilità genetica rispetto al biotipo mixed CV-C. E' noto che a quest'ultimo biotipo appartengono sia ceppi ad alta che a bassa virulenza (Devriese *et al.*, 1981) e che, secondo Vancraeynest *et al.* (2007), i ceppi ad alta virulenza sarebbero generalmente positivi per i geni *bbp*, *selm* e per la sequenza *flank*. In base ai pulsotipi ottenuti i ceppi appartenenti al biotipo mixed CV-C sono stati catalogati in 4 diversi cluster: A,B,D,E. I cluster A e D raccolgono isolati batterici provenienti da allevamenti in cui erano riferite problematiche di stafilococcosi limitate (1) o assenti (0). Questi ceppi erano sempre *cna- fnbB+*. I cluster B ed E raccolgono isolati batterici provenienti da allevamenti con problemi di stafilococcosi anche molto gravi, ma mentre in due allevamenti i ceppi sono risultati *fnbB-cna+bbp+flank+* in un altro allevamento i ceppi sono risultati *fnbB- cna+ bbp-flank-*. In sostanza questa indagine non sembra confermare l'ipotesi di Vancraeynest *et al.* (2007), secondo il quale gli episodi di stafilococcosi grave sarebbero sostenuti da popolazioni

clonali di ceppi *bbp+selm+flank+*. Dal nostro lavoro traspare una situazione più variegata, con cluster maggiormente associati a patologia (B ed E) rispetto ad altri (A,C,D); inoltre i cluster sembrano condizionati dall'origine commerciale dei riproduttori mentre all'interno del singolo allevamento si osserva una spiccata clonalità degli isolati. I cluster maggiormente virulenti (B ed E) sembrerebbero essere generalmente *fnbB-* e *cna+*, ma sia *bbp+flank+* che *bbp-flank-*, in disaccordo con quanto riportato da Vancraeynest *et al.* (2007). Questo studio preliminare dimostra l'utilità della PFGE, associata alla ricerca dei geni codificanti fattori di virulenza, per chiarire l'epidemiologia della stafilococcosi negli allevamenti cunicoli. I risultati da noi ottenuti dovranno essere verificati mediante indagini più ampie, ma, se confermati, aprirebero interessanti prospettive per la diagnosi e la profilassi della stafilococcosi del coniglio.

Tabella 1 – Genotipizzazione degli isolati batterici. Sono riportati esclusivamente i risultati della ricerca dei geni di virulenza rilevanti ai fini della discriminazione fra cluster.

| cluster PFGE | azienda | origine riproduttori | biotipo | Anamnesi | <i>bbp</i> | <i>flank</i> | <i>cna</i> | <i>fnbB</i> |
|--------------|---------|----------------------|---------|----------|------------|--------------|------------|-------------|
| A | 1 | 1 | CV-C | 0 | - | + | - | + |
| B | 2 | 2 | CV-C | 2 | - | - | + | - |
| C | 3-4-5 | 2 | umano | 0 | - | - | + | + |
| D | 6 | 1 | CV-C | 0 | - | - | - | + |
| | | | | | + | + | - | + |
| | 7 | 1 | CV-C | 1 | - | - | - | + |
| E | 7 | 1 | CV-C | 1 | + | + | + | - |
| | | | | | 8 | mista | CV-C | 3 |

BIBLIOGRAFIA – **Agnoletti**, F., Bano, L., Cocchi, M., Deotto, S., Ferro, T., Guolo, A., Drigo, I., Mazzolini, E., 2008. Prevalence of *Staphylococcus aureus* biotypes in commercial rabbit farms. Proc. 9th World Rabbit Congr., Verona, Italy, 895-898. **Agnoletti**, F., Bacchin, C., Bano, L., Bonci, M., Deotto, S., Ferro, T., Guolo, A., Marcon, B., Mazzolini, E., Drigo, I., 2009. Caratterizzazione genotipica di *Staphylococcus aureus* isolati da coniglio. Atti convegno nazionale ASIC, Forlì, Italia, in stampa. **Cookson**, B.D., Robinson, D.A., Monk, A.B., Murchan, S., Deplano, A., de Ryck, R., *et al.*, 2007. Evaluation of molecular typing methods in characterizing a european collection of epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains: the Harmony collection. J. Clin. Microbiol. 45: 1830-1837. **Devriese**, L.A., Godard, C., Okerman, L., Renault, L., 1981. Characteristics of *Staphylococcus aureus* strains from rabbits. Ann. Rech.Vét. 12: 327-332. **Martineau**, F., Picard, F.J., Roy, P.H., Ouellette, M., Bergeron, M.G., 1998. Species-specific and ubiquitous DNA based assays for rapid identification of *Staphylococcus aureus*. J. Clin. Microbiol. 36: 618-623. **O'Brien**, F.G., Udo, E.E., Grubb, W.B., 2007. Countour-clamped homogenous electric field electrophoresis of *Staphylococcus aureus*. Nature protocols 1: 3028-3033. **Vancraeynest**, D., Haesebrouck, F., Deplano, A., Denis, O., Godard, C., Wildemaewe, C., Hermans, K., 2006. International dissemination of a high virulence rabbit *Staphylococcus aureus* clone. J. Vet. Med. 53: 418-422. **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. **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.