

Caratterizzazione genotipica di *Staphylococcus aureus* isolati da coniglio

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

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: Genotypic characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from rabbit. In order to establish whether certain genes are usable as pathogenic markers of *Staphylococcus aureus* isolates from rabbit, 87 rabbit strains of *S. aureus* (43 belonging to the human biotype and 44 to the mixed CV-C biotype) and 35 strains collected from human patients (10 strains belonging to the mixed CV-A biotype and 25 to the human biotype) were PCR tested for 13 genes coding for virulence factors and for the *flank* DNA sequence. Results demonstrated that in *S. aureus* rabbit isolates *bbp*, *selm* and *flank* are more frequent in mixed CV-C biotype than in the human one (respectively $P=0,004$, $P=0,003$ and $P<0,001$). *Bap* is absent in rabbit *S. aureus* strains and *fnb B* is more frequent in the human biotype than in the mixed CV-C biotype ($P<0,001$). 79.5% of rabbit mixed CV-C biotypes hold *bbp*, *selm* and *flank* genes as well as 51% of rabbit strains belonging to the human biotype. *S. aureus* strains possessing the *bbp* and *selm* genes and the *flank* sequence were also detected in *S. aureus* isolated from human patients and belonging to mixed CV-A (20%) or human biotype (36%).

Key words: *Staphylococcus aureus*, Rabbit, Virulence

INTRODUZIONE – Tutti gli allevamenti intensivi di conigli possono essere considerati infetti da *Staphylococcus aureus* con una prevalenza interna media del 77% (Agnoletti *et al.*, 2008). La gravità delle lesioni determinate nei singoli soggetti, ma soprattutto la diffusione delle patologie nell'ambito del gruppo colpito, sembrano tuttavia legate alla virulenza del ceppo batterico, sebbene dovrebbero essere indagati anche aspetti relativi alla resistenza dell'ospite all'infezione. E' infatti nota l'esistenza di ceppi di *S. aureus* ad alta virulenza capaci di colonizzare rapidamente l'allevamento infetto, compromettendone la redditività (Devriese *et al.*, 1981; Hermans *et al.*, 1999). Questi ceppi appartengono solitamente al biotipo mixed CV-C ed al fagotipo 3A/3C/55/71 (Hermans *et al.*, 2003) e, secondo Vancraeynest *et al.* (2006), hanno un'origine clonale conseguente ai flussi commerciali dei conigli riproduttori. Negli ultimi anni lo studio di *S. aureus* si è focalizzato sulla ricerca di geni codificanti fattori di virulenza (adesine, tossine etc..) con l'obiettivo di spiegare la diversa gravità delle lesioni cliniche osservata in campo fra animali o allevamenti diversi. In particolare, i geni *bbp* e *selm*, codificanti rispettivamente la bone sialoprotein binding protein e l'enterotoxin like protein, unitamente ad una sequenza denominata *flank*, la cui funzione non è attualmente nota, sarebbero sempre presenti nei ceppi ad alta virulenza di *S. aureus* (Vancraeynest *et al.*, 2004). La disponibilità di metodi biomolecolari, meno costosi e più rapidi rispetto ai metodi di caratterizzazione fenotipici (biotipo e fagotipo), renderebbe quindi possibile l'applicazione di programmi di eradicazione nei confronti

dei ceppi ad alta virulenza di *S. aureus* nei centri di moltiplicazione dei conigli riproduttori (Vancraeynest *et al.*, 2007). Un precedente studio (Agnoletti *et al.*, 2008) ha evidenziato che negli allevamenti italiani sono riscontrabili sostanzialmente solo due biotipi di *S. aureus*: il biotipo umano, considerato poco patogeno, ed il biotipo non ospite specifico (NHS) mixed CV-C. Obiettivo del presente lavoro è stato quello di caratterizzare genotipicamente isolati batterici di coniglio appartenenti al biotipo umano e mixed CV-C al fine di evidenziare eventuali geni, o loro associazioni, capaci di distinguere i ceppi ad alta virulenza, appartenenti al biotipo Mixed CV-C, dai ceppi a bassa virulenza, appartenenti anche ad altri biotipi ed in particolare a quello umano. Ceppi di *S. aureus* isolati dall'uomo sono stati inseriti nell'indagine per verificare l'effettiva possibilità, sostenuta da Vancraeynest *et al.* (2007), di identificare i ceppi ad alta virulenza di *S. aureus* del coniglio sulla base della simultanea positività per i geni *bbp* e *selm* e per la sequenza *flank*.

MATERIALI E METODI – Per lo studio sono stati utilizzati 87 ceppi di *S. aureus* isolati da coniglio e provenienti da 65 allevamenti (43 appartenenti al biotipo umano e 44 al biotipo mixed CV-C) e 35 ceppi isolati dall'uomo (25 appartenenti al biotipo umano e 10 al biotipo mixed CV-A). 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. **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 per l'estrazione di DNA genomico da batteri Gram positivi. **PCR.** Sono stati utilizzati primer specifici per l'amplificazione dei geni *bbp*, *cna*, *eno*, *fnb B*, *fib*, *clf A*, *clf B*, *ebpS*, *fnbA*, *bap*, *ica A*, *ica D*, *selm* e per la sequenza *flank* (Vancraeynest *et al.*, 2004; Vancraeynest *et al.*, 2007). **Analisi dei dati.** I ceppi di *S. aureus* appartenenti al biotipo mixed CV-C sono stati posti a confronto con i biotipi umani stimando l'odds ratio (OR) quale misura di associazione tra biotipo e presenza di determinati geni; è stato quindi calcolato l'intervallo di confidenza al 95% dell'OR ed applicato il test statistico di Fisher (exact test) per valutare il significato di eventuali differenze osservate.

RISULTATI E CONCLUSIONI – I risultati delle analisi dei ceppi di *S. aureus* isolati da coniglio, esposti in tabella 1, evidenziano una maggiore frequenza dei geni *bbp* ($p=0,004$), *selm* ($p=0,003$) e della sequenza *flank* ($p<0,001$) nei ceppi appartenenti al biotipo mixed CV-C rispetto ai ceppi appartenenti al biotipo umano, suggerendo un loro ruolo nelle caratteristiche di virulenza di *S. aureus*, senza tuttavia che la contemporanea presenza di questi tre geni possa costituire un marker esclusivo di patogenicità. Infatti, sebbene il 79.5% dei ceppi isolati da coniglio ed appartenenti al biotipo mixed CV-C possieda i tre geni, un'elevata percentuale di stafilococchi appartenenti al biotipo umano sono risultati possedere sia i geni *bbp* e *selm* che la sequenza *flank* (51% degli isolati dal coniglio e 36% degli isolati dall'uomo), analogamente al 20% dei biotipi mixed CV-A isolati dall'uomo. Questi risultati sono in disaccordo con quanto riportato da Vancraeynest *et al.* (2007), dimostrando la difficoltà di identificare univocamente i ceppi ad alta virulenza di *S. aureus* del coniglio, in base alla sola determinazione dei geni *bbp*, *selm* e della sequenza *flank*.

Tabella 1 – Prevalenza di geni codificanti i fattori di virulenza nei ceppi di *S. aureus* isolati da coniglio e nei rispettivi biotipi e stima dell'associazione (odds ratio (OR) e intervallo di confidenza al 95% (IC)) tra la presenza dei geni ed i biotipi.

Gene	<i>S. aureus</i> (N. 87)		<i>S. aureus</i> (N. 87)				Associazione tra geni di <i>S. aureus</i> Mixed CV-C Vs Human		
			Biotipo Human (N. 43)		Biotipo Mixed CV-C (N. 44)		OR	IC 95%	Fisher test (<i>P</i>)
	N. positivi	%	N. positivi	%	N. positivi	%			
<i>bbp</i>	56	64,4	21	48,8	35	79,5	4,07	1,49 -11,12	0,004
<i>cna</i>	56	64,4	29	67,4	27	61,4	0,77	0,31 - 1,86	0,656
<i>fnb A</i>	70	80,5	33	76,7	37	84,1	1,60	0,54 – 4,74	0,429
<i>fnb B</i>	38	43,7	28	65,1	10	22,7	0,16	0,05 – 0,45	<0,001
<i>fib</i>	74	85,1	35	81,4	39	88,6	1,78	0,53 – 6,04	0,383
<i>clf A</i>	78	89,7	39	90,7	39	88,6	0,80	0,20 – 3,23	1,000
<i>clf B</i>		89,7	39	90,7	39	88,6	0,80	0,20 – 3,23	1,000
<i>ebpS</i>	70	79,5	33	76,7	37	84,1	1,60	0,54 – 4,74	0,429
<i>eno</i>	74	85,1	35	81,4	39	88,6	1,78	0,53 – 6,04	0,383
<i>bap</i>	0	0	0	0	0	0	-	-	-
<i>ica A</i>	70	80,5	31	72,1	39	88,6	3,02	0,93 – 9,80	0,062
<i>ica D</i>	75	86,2	37	86	38	86,4	1,03	0,30 – 3,5	1,000
<i>flank</i>	63	72,4	22	51,2	41	93,2	13,04	2,91-58,44	<0,001
<i>selm</i>	58	66,7	22	51,2	36	81,8	4,29	1,53-12.0	0,003

RINGRAZIAMENTI – Il presente lavoro è stato realizzato grazie al finanziamento concesso dal Ministero della Salute nell'ambito del progetto di ricerca RC IZS VE 01/05.

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. In: Proc. 9th World Rabbit Congress, Verona, Italy, pp. 895-898. **Devriese, L.A.**, Godard, C., Okerman, L., Renault, L., 1981. Characteristics of *Staphylococcus aureus* strains from rabbits. Ann. Rech.Vét. 12:327-332. **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. **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. **Vancraeynest, D.**, Haesebrouck, F., Deplano, A., Denis, O., Godard, C., Wildemauwe, 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.