

Tipizzazione genetica e biochimica di *Staphylococcus aureus* isolati da conigli allevati intensivamente

E. Circella¹, M.L. Corrente¹, L. Greco², D. Pennelli³, G. Bruni¹, A. Madio¹, S. El Ammouri¹, N. Mangano⁴, A. Camarda¹

¹Dipartimento di Sanità e Benessere Animale, Università degli Studi di Bari;

²Veterinario Libero Professionista; ³Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna; ⁴A.P.A. Potenza

Corresponding Author: Prof. Antonio Camarda, Dipartimento di Sanità e Benessere Animale – Facoltà di Medicina Veterinaria, S.P. per Casamassima Km 3 - 70010 Valenzano (Bari), Tel.-Fax: +39 080 4679910. E-mail: a.camarda@veterinaria.uniba.it

ABSTRACT: Genetic and biochemical typing of *Staphylococcus aureus* isolated from rabbits. *Random Amplified Polymorphic DNA* and the *API Staph* (Biomérieux) method were applied for typing n. 29 *Staphylococcus aureus* strains isolated from rabbits in Southern Italy. Nine *API Staph* profiles and 12 *RAPD* types were determined respectively. The prevalence of the *API Staph* “f” (code: #673 61 13#) and of the *RAPD-1* types, isolated respectively from 4 and 5 rabbitries has been reported. The carrying over of strains in a farm with chronic staphylococcosis monitored in different years using both typing methods was observed. The results obtained do not help to define the virulence of strains.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, *RAPD*, biochemical typing.

INTRODUZIONE – La stafilococcosi è una patologia tipica degli allevamenti cunicoli intensivi che si manifesta con un quadro clinico ed anatomo-patologico eterogeneo (Grilli *et al.*, 1997; Hermans *et al.*, 1999). Il diverso comportamento epidemiologico e clinico della malattia ha portato ad ipotizzare che possano esistere differenze nelle caratteristiche degli stipiti, in grado di influenzare, probabilmente insieme ad altri fattori, l'evoluzione del focolaio e la sua gravità. Lo sviluppo della biologia molecolare ha aperto nuovi scenari alla ricerca, mettendo a disposizione metodiche dotate di notevole sensibilità ed affidabilità da poter usare per applicazioni di tipo epidemiologico. Tra queste, la *Random Amplified Polymorphic DNA* (*RAPD*) ha avuto negli ultimi anni una notevole diffusione nel monitoraggio delle popolazioni batteriche complesse sia in medicina umana che veterinaria (Benter *et al.*, 1995; Hermans *et al.*, 2000; Matthews *et al.*, 1994). In questo lavoro la *Random Amplified Polimorphic DNA* (*RAPD*) è stata utilizzata per tipizzare stipiti di *Staphylococcus (S.) aureus* isolati da conigli deceduti a seguito della malattia, in allevamenti intensivi della Puglia. I risultati ottenuti sono stati confrontati con quelli derivanti dalla tipizzazione biochimica dei ceppi.

MATERIALI E METODI – Le ricerche sono state condotte su n. 29 ceppi di *S. aureus* isolati da conigli provenienti da n. 9 allevamenti intensivi della Puglia, inviati a scopo diagnostico alla Sezione di Patologia Aviare del Dipartimento di Sanità e Benessere degli animali dal febbraio 2000 al dicembre 2003. Gli stipiti sospetti sono stati identificati mediante gallerie biochimiche *API Staph*

(Biomerieux – Roma). Il codice d'identificazione ottenuto sulla base delle risposte ai test biochimici è stato utilizzato come profilo per la tipizzazione biochimica del germe (Su *et al.*, 2000). La tipizzazione genetica è stata effettuata secondo quanto descritto da Hermans *et al.* (2000). Per l'allestimento della RAPD è stato utilizzato il kit "Ready to Go – RAPD Analysis Beads" (Amersham Biosciences). Il primer utilizzato presentava la seguente sequenza: 5'-AAGACGCCGT-3'. Il programma di amplificazione era così costituito: un ciclo a 95°C per 5 minuti; 45 cicli : 95°C per 1 minuto, 36°C per 1 minuto e 72°C per 2 minuti. Ciascun campione è stato amplificato per almeno tre volte al fine di accertare la ripetibilità della prova. L'elettroforesi del prodotto di amplificazione è stata eseguita a 150V per 3 ore in gel di agarosio al 2%. Come marker di riferimento è stato utilizzato il DNA Ladder Mix 1Kb (MBI Fermentas).

RISULTATI E CONCLUSIONI – Gli stipiti testati, identificati come *S. aureus* utilizzando le gallerie biochimiche *API Staph* (Bio Merieux) sono stati distinti in n. 9 diversi patterns biochimici (Tab. 1). Di questi, il profilo "f" è risultato maggiormente diffuso negli allevamenti.

Più tipi biochimici potevano essere contemporaneamente presenti in uno stesso gruppo di animali, come nel caso delle aziende 3 e 7. La RAPD ha evidenziato fra gli stipiti di *S. aureus* ben 12 differenti patterns. I profili 1 e 6 sono risultati quelli più diffusi. Il confronto tra patterns genetici e biochimici non ha consentito di individuare corrispondenze univoche tra i tipi. Ad esempio al profilo RAPD-1 potevano essere associati i tipi biochimici "a", "b", "d" "f", a quello RAPD-6 corrispondevano i tipi "i" ed "f". Per contro, ad uno stesso pattern biochimico corrispondeva più di un profilo RAPD. Nell'azienda n.7, si è verificata la sostituzione nel tempo dei tipi genetici e biochimici di *S. aureus* associati a malattia (Tab. 1).

Tabella 1: Profilo biochimico e genetico di ceppi di *S. aureus* isolati da conigli allevati intensivamente

Stipite n.	Allevamento n.	Anno di isolamento	Profilo API <i>Staph</i>	Profilo RAPD
1 - 2	1	2000	a	1
3		2000	a	2
4	2	2000	g	3
5		2000	g	4
6	3	2000	i	6
7		2000	f	7
8		2000	d	-
9		2000	f	1
10		2000	i	10
11	4	2002	b	1
12	5	2002	e	8
13	6	2002	f	1
14		2003	f	9
15	7	2000	d	1
16		2000	c	5
17		2002	f	6
18		2002	f	6
19		2003	i	10
20-26		2003	i	10
27	8	2003	f	6
28	9	2003	h	11
29		2003	g	12

Le prove di tipizzazione genetica e biochimica degli *S. aureus* hanno consentito

un'efficace discriminazione degli stipiti testati. In particolare tramite API *Staph*, contestualmente all'identificazione dello stipite, si è avuta la possibilità di disporre di un primo screening di differenziazione tra i ceppi evidenziando una consistente variabilità fenotipica tra gli stipiti circolanti negli allevamenti cunicoli. Il tipo di *S. aureus* più rappresentato in queste ricerche, (profilo "f" codice: #673 61 13#). è stato segnalato quale responsabile di mastite bovina in ricerche di Su *et al.* (2000), i quali riportano, inoltre, a partire da latte mastitico bovino, l'isolamento dei tipi "d" (cod.#672 61 53#), "e" (cod. #673 61 12#), "h" (cod. #673 61 52#) e "g" (cod. #673 61 51#), nonché la prevalenza del tipo "i" (cod. #673 61 53#). Rispetto al metodo API *Staph*, la RAPD si è dimostrata maggiormente discriminante. In queste ricerche, sia pur limitate per il numero ridotto di stipiti batterici testati, è stata evidenziata la diffusione prevalente di uno specifico genotipo (RAPD-1), il quale, peraltro, ha circolato negli allevamenti in annate successive. Questo dato concorda con quanto evidenziato da Hermans *et al.* (2000) i quali ipotizzano che la malattia clinica in una certa area geografica possa essere riconducibile all'azione di pochi genotipi se non addirittura avere un'origine clonale e segnalano la circolazione di *S. aureus* con medesimo profilo RAPD ancora a distanza di quindici anni. I tipi genetici che riescono a prevalere sugli altri potrebbero essere dotati di un potere patogeno più elevato (Su *et al.*, 2000). Questi avrebbero maggiori possibilità di superare le difese dell'organismo, raggiungere più facilmente gli organi bersaglio e determinare la malattia. I risultati delle nostre ricerche non consentono di trarre indicazioni circa il potere patogeno degli stipiti testati né di associare un particolare profilo genetico a forme cliniche più o meno gravi come invece riportato da Hermans *et al.* (2000). Vi è da dire, peraltro, che il riscontro di un avvicendamento temporale degli stipiti responsabili di malattia in allevamento potrebbe essere favorito nei diversi cicli produttivi dall'introduzione di nuove fattrici da rimonta portatrici sane o da altri tipi di vettori inanimati ed animati, tra cui l'uomo, notoriamente serbatoio asintomatico del germe (Peacock *et al.*, 2001). Ulteriori ricerche sono necessarie in tal senso, anche in considerazione della possibilità di disporre della RAPD come mezzo da impiegare per la caratterizzazione ed il confronto di detti isolati dalle diverse fonti.

BIBLIOGRAFIA – Benter T., Papadopoulos S., Pape M., Manns M. and Poliwoda H. 1995. Optimization and reproducibility of Random Amplified Polymorphic DNA in Human. *Analytical Biochemistry* 230: 92-100. **Grilli G.,** Toccaceli S. and Gallazzi D. 1997. "Le Stafilococcosi del coniglio". *Riv. di coniglicoltura*. 6: 24-29. **Hermans K.,** DeHerdt P., Devriese L.A., Hendrickx W., Godard C. and Haesebrouck F. 1999. "Colonisation of rabbits with *Staphylococcus aureus* in flocks with and without chronic staphylococcosis". *Vet. Microbiol.* 67: 37-46. **Hermans K.,** Haesebrouck F., Vaneechoutte M., Devriese L.A., Godard C. and DeHerdt P. 2000. Differentiation between high and low virulence *Staphylococcus aureus* strains from rabbits by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. *Veterinary Microbiology* 72: 311-319. **Matthews K.R.,** Kumar S.J., O'Conner S.A., Harmon R.J., Pankey J.W., Fox L.K. and Oliver S.P. 1994. Genomic fingerprints of *Staphylococcus aureus* of bovine origin by polymerase chain reaction based fingerprinting. *Epidemiol. Infect.* 112: 177-186. **Peacock S.J.,** De Silva I., Lowy F.D. 2001. What determines nasal carriage of *Staphylococcus aureus*? 2001. *Trends in Microbiol.* 9(12): 605-610. **Su C.,** Kanevsky I., Jayarao B.M. and Sordillo L.M. 2000. Phylogenetic relationships of *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis based on coagulase gene polymorphism. *Vet. Microbiol.* 71: 53-58.