

**Presenza dei geni *icaA* e *icaD* e formazione del biofilm in ceppi di *Staphylococcus aureus* isolati nel coniglio**

**Cocchi M., Di Giusto T., Deotto S., Bacchin C., Clapiz L., Genero N., Di Sopra G., Bregoli M., Passera A., Drigo I.**

Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Sezione territoriale di Udine, Italy

*Corresponding Author:* Monia Cocchi, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Via della Roggia, 100, 33030 Basaldella di Campoformido (UD), Italy - Tel. +39 0432 561529 - Fax: +39 0432 562676 - Email: mcocchi@izsvenezie.it

**ABSTRACT: Detection of intercellular adhesion genes and biofilm production in *Staphylococcus aureus* strains isolated from rabbit.** In commercial rabbitries, pathologies due to *Staphylococcus aureus* are considered one of the most important causes of economic losses. The pathogenesis of the *Staphylococcus aureus* infection is related to various factors which promote the adhesion and the colonization to the host surfaces (toxins, extracellular factors and polysaccharidic biofilm). Moreover, the biofilm formation represents a key factor for protection against phagocytosis and antimicrobial agents. It is considered responsible for chronic infections, too. One hundred and four *Staphylococcus aureus* strains isolated from rabbits affected by mastitis were evaluated for slime production by Congo Red agar test (CRA) and by a specific PCR based procedure. Results indicate that 6/104 (6%) strains showed the phenotypic trait, whereas 104/104 (100%) were positive to molecular characterization.

Key words: *Staphylococcus aureus*, *IcaA* gene, *IcaD* gene, Biofilm formation.

**INTRODUZIONE** – Nell'allevamento cunicolo *Staphylococcus aureus* rappresenta, insieme a *Pasteurella multocida*, uno dei più frequenti agenti di infezione piogena a carico di diversi distretti (cute, annessi cutanei, apparato respiratorio e genitale). La patogenesi dell'infezione è legata all'effetto combinato di diversi fattori di virulenza; fra di essi si annoverano tossine, fattori extracellulari e la capacità del microrganismo di formare il biofilm. La produzione del biofilm, definito come "una comunità strutturata di cellule batteriche racchiuse in una matrice polimerica autoproducentesi ed aderente ad una superficie inerte o no" (Costerton *et al.*, 1999) è associata sia ad una maggiore capacità di *Staphylococcus aureus* di aderire e colonizzare i tessuti dell'ospite che ad una maggiore capacità di eludere le difese immunitarie. La formazione del biofilm è inoltre implicata nei meccanismi di cronicizzazione dell'infezione e nell'aumentata resistenza del microrganismo agli antimicrobici (Melchior *et al.*, 2006). Essa viene regolata a livello genetico dall'*intracellular adhesion (ica) locus*, che controlla la sintesi di un'adesina, PIA (polysaccharide intercellular adhesin), molecola di natura polisaccaridica che permette l'adesione intercellulare. L'*ica locus* è costituito dai geni *icaADBC* che codifica proteine mediante la sintesi di PIA nei ceppi di *Staphylococcus aureus*. Fra di essi, *icaA* e *icaD* giocano un ruolo fondamentale nella formazione del biofilm. In particolare, il gene *icaA* codifica per l'enzima N-acetilglucosaminiltransferasi, implicato nel processo di formazione del biofilm. La completa espressione fenotipica del tratto genetico è determinata dall'espressione contemporanea sia dell'*icaA* che dell'*icaD* (Arciola *et al.*, 2002).

Scopo del presente lavoro è stato valutare la presenza dei geni *icaA* e *icaD* in ceppi di *Staphylococcus aureus* isolati da coniglie affette da mastite, valutando inoltre fenotipicamente la formazione del biofilm.

**MATERIALI E METODI** – 104 ceppi di *S. aureus*, isolati in corso di mastite, sono stati sottoposti alle seguenti indagini fenotipiche e genotipiche.

Analisi fenotipica. Le colonie di *Staphylococcus aureus* sono state inoculate su Congo Red Agar (CRA), allestito secondo quanto descritto da Arciola *et al.* (2002). Le piastre sono state incubate per 48 ore a  $37 \pm 2^\circ\text{C}$ , in condizioni di aerobiosi e successivamente poste per ulteriori 24-48 ore a temperatura ambiente. La valutazione delle colonie è stata basata su un'evidenza colorimetrica: le colonie producenti il biofilm apparivano nere/nero-grigie/grigie su fondo rosso, mentre le colonie non producenti il biofilm apparivano rosa/rosso su fondo scuro. *S. epidermidis* ATCC 35984 e *S. epidermidis* ATCC 12228 sono stati utilizzati quali controllo positivo e negativo di reazione, rispettivamente. Analisi genotipica. Il DNA è stato estratto utilizzando il kit commerciale "GeneElute Bacterial genomic DNA kit" (Sigma-Aldrich). La ricerca geni *icaA* e *icaD* è stata eseguita secondo quanto descritto da Tristan *et al.* (2003).

**RISULTATI E CONCLUSIONI** – L'indagine fenotipica ha evidenziato 6/104 (6%) ceppi producenti il biofilm (biofilm +), mentre 98/104 (94%) non producenti il biofilm (biofilm -). Genotipicamente, invece, 104/104 (100%) ceppi di *Staphylococcus aureus* erano positivi alla ricerca per i geni *icaA* e *icaD*.

L'analisi fenotipica condotta evidenzia una elevata prevalenza di ceppi biofilm -, diversamente l'analisi genotipica sottolinea un'ampia diffusione dei geni responsabili della formazione del biofilm. Uno studio condotto su ceppi di *Staphylococcus aureus* isolati in corso di mastite bovina ha evidenziato una prevalenza dei geni codificanti il biofilm pari al 100%, e una percentuale pari al 70% di ceppi positivi al CRA test. (Vasudevan *et al.*, 2003). Arciola *et al.* (2002), inoltre, descrivono ceppi fenotipicamente "biofilm negativi, genotipicamente positivi", in cui la mancata espressione genica è associata ad una mutazione puntiforme o a fattori interferenti l'espressione genica stessa. L'espressione del locus genico è infatti, altamente variabile, influenzato ad esempio da riarrangiamenti genomici. Baselga *et al.* (1993) hanno dimostrato come l'espressione fenotipica del biofilm risenta delle condizioni di coltivazione del microrganismo, come ad esempio l'atmosfera di incubazione. Nel presente lavoro, l'incubazione di alcuni ceppi sia in aerobiosi che in anaerobiosi (dati non pubblicati) non ha evidenziato differenze significative di crescita e di espressione fenotipica sia nei ceppi biofilm + che in quelli biofilm -. Nel presente lavoro, inoltre, l'adozione della scala cromatica per la lettura delle piastre e il prolungamento dell'incubazione a 96 ore hanno permesso, nel primo caso, di ridurre la possibile variabilità legata all'interpretazione dell'operatore, mentre nel secondo caso, ha permesso di apprezzare in modo più corretto il colore delle colonie. Infatti, la lettura effettuata a 48 ore permetteva di apprezzare in modo esaustivo il colore delle colonie solo nei ceppi positivi; nel caso dei ceppi negativi, invece, la lettura a 48 ore permetteva una corretta interpretazione solo nel 70% (ca) dei ceppi. Nei ceppi sottoposti ad esame, inoltre, non è stata registrata la formazione di *spikes* di colore rosa/rosso all'interno di colonie nere (positive), variazione descritta in ceppi isolati in corso di infezione nell'uomo (Arciola *et al.*, 2002). Dal confronto del profilo di antibiotico resistenza dei ceppi genotipicamente e fenotipicamente positivi e dei ceppi genotipicamente positivi

ma fenotipicamente negativi non emerge una significativa differenza nel profilo di antibiotico resistenza (dati non pubblicati). Diversamente, vari autori sottolineano una ridotta sensibilità agli antimicrobici in ceppi di *Staphylococcus aureus* biofilm +, isolati da mastite bovina (Vasudevan *et al.*, 2003).

*Staphylococcus aureus* nell'allevamento del coniglio costituisce un'importante problema, poiché rappresenta una delle cause principali di riforma delle fattrici. Secondo gli autori, questo costituisce il primo studio sulla presenza genotipica e fenotipica del fattore biofilm condotto su ceppi di *Staphylococcus aureus* isolati da coniglio.

Considerando l'elevata distribuzione dei geni nei ceppi di *Staphylococcus aureus*, ulteriori indagini sono necessarie per stabilire l'esatto ruolo del biofilm quale fattore di virulenza in tali ceppi. Si sottolinea la necessità di associare l'analisi fenotipica a quella genotipica nello studio del biofilm.

**BIBLIOGRAFIA** – Arciola, C.R., Capoccia, D., Gamberoni, S., Cervellati, M., Donati, E., Montanari, L., 2002. Detection of slime production by means of an optimised Congo Red gar plates based on a colourimetric scale in *Staphylococcus epidermidis* clinical isolate genotyped for *ica locus*. *Biomaterials* 23:4233-4239. **Baselga**, R., Albizu I., De La Cruz, M., Del Cacho, E., Barberan, M., Amorena, B., 1993. Phase variation of slime production in *Staphylococcus aureus*: implication in colonization and virulence. *Infect. Immun.* 61:4857-4862. **Costerton**, J.W., Stewart, P.S., Greenberg, E.P., 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284:1318-1322. **Melchior**, M.B., Gremmels, J.F., Gaastra, W., 2006. Comparative assesment of the antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis in biofilm versus planktonic culture. *J. Vet. Med. B.* 53:326-332. **Tristan**, A., Ying, L., Bes, M., Etienne, J., Vandenesch, F., Lina, G., 2003. Use of multiplex PCR to identify *Staphylococcus aureus* adhesins involved in human hematogenous infections. *J. Clin. Microbiol.* 41:4465-4467. **Vasudevan**, P., Nair, MM., Annamalai, T., Venkitanara, KS., 2003. Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation. *Vet Microbiol.* 92:179-185.