

**Ricerca Corrente IZS SA 06/09**

**Responsabile Dr.ssa Tola Sebastiana**

**Scadenza del progetto 31/08/2011**

**Caratterizzazione mediante PCR e PFGE della collezione di *Staphylococcus aureus* (1986-1997) isolati da focolai di mastite ovina o caprina e utilizzati per la produzione di vaccini stabulogeni**

### **Relazione finale**

**Dott. Giuseppe Schianchi**

**Responsabile U.O.n° 1**

**Dott.ssa Sebastiana Tola**

**Responsabile U.O.n° 2**

**Ricerca finanziata dal Ministero del Lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali; Dipartimento per la Sanità Pubblica Veterinaria, la Nutrizione e la Sicurezza degli Alimenti**

## **Indice generale ed elenco**

<b>Introduzione</b>	<b>pag</b>	<b>4</b>
<b>Materiali e metodi</b>	<b>pag</b>	<b>9</b>
<b>Risultati</b>	<b>pag</b>	<b>17</b>
<b>Discussione</b>	<b>pag</b>	<b>25</b>
<b>Bibliografia</b>	<b>pag</b>	<b>26</b>

## **Elenco dei collaboratori**

### **U.O. n°1**

- Dr. Schianchi Giuseppe - coordinamento**
- Sig.ra Barbato Antonella-scongellamento ceppi e antibiotico-resistenza**
- Sig. Fiori Angelo- scongelamento ceppi e antibiotico-resistenza**

### **U.O.n°2**

- Dr.ssa Tola Sebastiana – coordinamento**
- Dr.ssa Cillara Grazia- ricerca e analisi di laboratorio**
- Dr.ssa Piras Maria Giovanna- ricerca e analisi di laboratorio**

## Sintesi

In questa ricerca abbiamo analizzato 159 isolati di *Staphylococcus aureus* provenienti dalla collezione del Dipartimento Produzioni dell'IZS della Sardegna. Gli isolati, raccolti dal 1986 al 1997, sono stati utilizzati per la produzione di vaccini stabulogeni in base al D.M. 17/3/94 n° 287. La caratterizzazione fenotipica è stata effettuata mediante l'utilizzo di piastre di Congo Red agar mentre la presenza dei geni *icaA*, *icaD* e *bap* è stata determinata mediante PCR. Tutti gli isolati analizzati sono risultati non produttori di slime. In questo lavoro è stata determinata anche la presenza dei geni per le enterotossine (SE). Negli isolati di *S. aureus* è stata riscontrata la sola presenza dei geni per le tossine *sec* e *seb*. La caratterizzazione genotipica è stata effettuata mediante *spa* typing e Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE). I più frequenti tipi di *spa* sono risultati: t1773 (71.7%), t3629 (12.5%), t7754 (4.4%) e t1403 (4.4%). In base al profilo elettroforetico ottenuto con la PFGE, gli isolati sono stati raggruppati in 9 clusters con una similarità del 75%. Il 2.5% degli isolati di *S. aureus* sono risultati resistenti a 3 dei 14 antibiotici testati (penicillina, streptomina e kanamicina). Nessun isolato è risultato resistente alla meticillina.



## Summary

One hundred fifty-nine *Staphylococcus aureus* isolates, collected from ovine intramammary infections in Sardinia, were tested for slime production. Phenotypic characterization was carried out using Congo Red agar plate (CRA plate test), while the presence of *icaA*, *icaD* and *bap* genes were evaluated by PCR. All isolates tested lacked of slime production and presence of both *ica* and *bap* genes. A second aim of this study was to determine the presence of staphylococcal enterotoxin (SE) genes. Among investigated isolates, only *sec* and *seb* toxin genes were detected. In this study, we analyzed 159 *S. aureus* isolates by *spa* typing, Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) and antimicrobial susceptibility. The most frequent *spa* types were t1773 (71.7%), t3629 (12.5%), t7754 (4.4%) and t1403 (4.4%). Based on PFGE typing by *Sma*I macrorestriction, *S. aureus* isolates were grouped into nine clusters at 75% similarity level. Isolates showed resistance below 3% against penicillin, streptomycin and kanamycin. No resistance was detected to methicillin.

## INTRODUZIONE

Negli allevamenti di ovini a produzione latte il problema sanitario decisamente più rilevante è l'insorgenza delle mastiti infettive; mancato reddito, scadimento del benessere degli animali, residui di antibiotici e aumento dell'antibiotico resistenza sono i danni economico-sociali maggiori. Diverse sono le specie batteriche causa di queste patologie che colpiscono la mammella: fra queste un ruolo importante, anche perché frequentemente riscontrato, è rivestito dallo *Staphylococcus aureus*. Lo *S. aureus* negli ovini e nei caprini è responsabile della cosiddetta mastite gangrenosa; una volta penetrato in mammella attraverso l'orifizio del capezzolo e il dotto papillare, favorito da lesioni cutanee di diversa origine, sviluppa intensamente nella ghiandola mammaria che aumenta di volume, di consistenza e di temperatura. La mastite può svilupparsi in una forma acuta, che spesso porta a morte l'animale colpito, o, raramente, in una forma subclinica a evoluzione cronica.

Il controllo della sua diffusione e la prevenzione sono importanti per la salvaguardia della sanità animale, per limitare le perdite economiche e, indirettamente, per la tutela della salute dell'uomo, essendo lo *S. aureus* un patogeno rilevante nelle infezioni nosocomiali e nelle tossinfezioni alimentari

Nei confronti della mastite stafilococcica, da oltre un ventennio, l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna ha avuto particolare attenzione svolgendo attività di diagnostica, di ricerca e di profilassi mediante l'impiego di vaccini stabulogeni preparati nei propri laboratori.

La produzione di vaccini stabulogeni, è autorizzata con decreto del Ministro della Sanità, a seguito dell'invio di tutti i protocolli di preparazione e di ispezione tecnica dell'Istituto Superiore di Sanità, come previsto dal D.M. del 17 marzo 1994 n°287, regolamento che reca le norme sulla produzione, l'impiego ed il controllo dei medicinali veterinari immunologici aventi caratteristiche di vaccini stabulogeni.

Attualmente nella ceppoteca del Dipartimento Produzioni sono conservati migliaia di ceppi di *Staphylococcus aureus*. Di ogni ceppo si conosce l'anno d'isolamento, l'azienda di appartenenza del capo ovino o caprino, e l'ubicazione geografica dell'azienda.

Con il seguente progetto di RC ci siamo posti l'obiettivo di

- 1) analizzare l'antibiotico resistenza mediante l'utilizzo di tredici antibiotici compresa la meticillina;
- 2) tipizzare la cassetta genomica SCC $mec$  dei ceppi meticillino resistenti;
- 3) valutare la presenza dei geni codificanti per adesine e tossine
- 4) effettuare uno studio epidemiologico delle infezioni da *S. aureus* negli ovini e caprini mediante l'elettroforesi pulsata (PFGE) e *spa* typing.

Queste conoscenze potranno essere utilizzate per il miglioramento delle preparazioni vaccinali.

La virulenza dello *S. aureus* dipende dalla produzione di esotossine, di proteine di superficie e di una matrice extracellulare di natura polisaccaridica (Aguilar et al., 2001; Takeuchi et al., 2001). L'adesione dello *S. aureus* all'epitelio della ghiandola mammaria è considerato essere il primo step critico nella patogenesi della mastite (Cifrian et al., 1994). La maggior parte dei ceppi di *S. aureus* che causano mastite hanno la capacità di formare biofilms, complessi multicellulari altamente organizzati che rappresentano un importante fattore di virulenza. La formazione di biofilm richiede, come primo step, l'attacco del batterio a superfici solide seguito dal suo sviluppo in multistrato e dalla produzione di una matrice esopolisaccaridica

che avvolgerà i multistrati batterici (Cucarella *et al.*, 2001; Vasudevan *et al.*, 2003; Fox *et al.*, 2005; Melchior *et al.*, 2006b; Clutterbuck *et al.*, 2007). L'insieme di queste strutture blocca o limita l'azione fagocitica delle cellule del sistema immunitario (opsonofagocitosi) e quella degli agenti antimicrobici. Inoltre, il rilascio di cellule batteriche planctoniche dagli strati più esterni permette la persistenza delle infezioni batteriche (Arciola *et al.*, 2001; Vasudevan *et al.*, 2003; Fox *et al.*, 2005; Melchior *et al.*, 2006b). Tali caratteristiche permettono agli stafilococchi che causano mastite, l'efficace adesione all'epitelio della ghiandola mammaria, la successiva colonizzazione e la persistenza dell'infezione. La formazione del biofilm è un processo a due steps dove i batteri, prima, aderiscono alla superficie attraverso un antigene di superficie chiamato "Polisaccaride Capsulare/Adesina" (PS/A) o, nel caso dello *S. aureus*, "biofilm-associated protein o Bap" e, successivamente, formano un multistrato grazie ad un'attiva moltiplicazione cellulare. Il biofilm di natura polisaccaridica è costituito principalmente da polimeri di N-acetil  $\beta$ -1,6 glucosamina (PNAG). Questo omopolimero è chiamato PIA (adesina polisaccaridica intercellulare), negli *S. epidermidis* (Mack *et al.*, 1996) e PNAG negli *S. aureus* (Maira-Litran *et al.*, 2002). Il polimero è sintetizzato da proteine prodotte dall'operone *ica*. Il locus dell'adesione intercellulare (intercellular adhesion, *ica*) comprende i geni *ica* A,B,C, e D che codificano per le proteine che mediano la sintesi di PIA e PNAG negli stafilococchi (McKenney *et al.*, 1998; Cramton *et al.*, 1999). Tra i geni *ica*, si è visto che i geni *icaA* e *icaD* giocano un ruolo importante nella formazione del biofilm sia in *S. aureus* che in *S. epidermidis*. Il gene *icaA* codifica per N-acetilglucosaminil-transferasi, enzima coinvolto nella sintesi degli oligomeri di N-acetilglucosamina a partire dall'UDP-N-acetilglucosamina (Arciola *et al.*, 2001). Il gene *icaD* esercita un ruolo critico nell'espressione massima di N-acetilglucosaminil-transferasi, indispensabile per l'espressione fenotipica del polisaccaride capsulare (Gerke *et al.*, 1998). La correlazione tra produzione fenotipica del biofilm e presenza dei geni *ica* è stata ben studiata sia negli stafilococchi che causano infezioni nosocomiali che in quelli responsabili di mastiti bovine. Al contrario pochissimi studi riguardano gli stafilococchi responsabili di mastiti ovine.

Oltre alla produzione biofilm, la virulenza dello *S. aureus* è associata alla produzione di enterotossine (SEs). In questa ricerca abbiamo testato la presenza, nei 159 isolati di *S. aureus*, dei geni per i principali tipi antigenici di SEs (SEA-SEB-SEC-SED-SEE).

Parecchi metodi di tipizzazione molecolare sono stati utilizzati per ottenere una rapida e accurata caratterizzazione degli isolati di *S. aureus*. Tra questi, quelli maggiormente applicati sono il Typing della coagulasi (*coa typing*) o della proteina A (*spa typing*), il Multiple-Locus Variable-Number Tandem-Repeat (MLVA), la Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE), il Multilocus Sequence Typing (MLST) e l'Amplified Fragment Length polymorphism (AFLP). In questa ricerca abbiamo analizzato i 159 isolati sia con la tecnica di PFGE che con lo *spa typing*.

L'attacco dello *S. aureus* alla cellule e ai tessuti dell'ospite è lo step essenziale nel processo di colonizzazione (Foster & Hook, 1998). L'adesione è mediata da una famiglia di proteine, in molti casi ancorate covalentemente al peptidoglicano cellulare, definite genericamente con l'acronimo MSCRAMM (microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules) che si legano in maniera specifica a distinti componenti extracellulari dei tessuti dell'ospite (Patti *et al.*, 1994). Il *clumping factor A* (ClfA) ad es. è uno dei MSCRAMM che promuove il legame del fibrinogeno alla superficie batterica. In questa ricerca, oltre al *clfA*, abbiamo analizzato la presenza in tutti gli isolati dei geni codificanti per le seguenti proteine di superficie: *bbp* (bone binding protein), *cna* (collagen

binding protein), *fnbA/b* (fibronectin A e B binding protein), *ebpS* (elastin binding protein), *eno* (laminin binding protein), *fib* (fibrinogen binding protein ) e sdr (codificante per 3 proteine- SdrC, SdrD e SdrE-, con sequenze multiple di serina- aspartato ma con funzioni ancora non ben stabilite).

## MATERIALI E METODI

### Ceppi analizzati (U.O.n°1)

Un totale di 159 isolati di *S. aureus*, collezionati tra il 1986 e il 1997, sono stati analizzati in questa ricerca (Tabella 1).

ISOLATO	LOCALITA'	ANNO	ISOLATO	LOCALITA'	ANNO
905	Mulgargia	1986	1576	Mores	1988
927	Osilo	1986	1617	Berchidda	1988
930	Bulzi	1986	1618	Porto Torres	1988
1000	N.R.	1986	1634	Oniferi	1988
1002	Benetutti	1986	1635	Onifei	1988
1003	N.R.	1986	1796	Villasor	1988
1004	Ittiri	1986	1875	Ghilarza	1988
1005	N.R.	1986	1960	Luras	1988
1006	Bonorva	1986	2001	Olbia	1989
1007	Torralba	1986	2004	Ghilarza	1989
1008	Berchidda	1986	2005	Siniscola	1989
1009	Osilo	1986	2037	Gesico	1989
1010	La Corte	1986	2097	Dorgali	1989
1011	N.R.	1986	2264	Berchidda	1989
1012	N.R.	1986	2362	Flussio	1990
1013	N.R.	1986	2374	Suni	1990
1014	Borore	1987	2375	Usini	1990
1015	Fonni	1987	2379	Fonni	1990
1036	Tergo	1987	2383	Isili	1990
1042	Giave	1987	2402	Orune	1990
1056	Ittiri	1987	2404	Castelsardo	1990
1062	Tula	1987	2409	Olbia	1990
1064	Oschiri	1987	2410	Nulvi	1990
1107	Torralba	1987	2413	Isili	1990
1108	Ploaghe	1987	2418	Cossoine	1990
1114	Bolotana	1987	2427	Abbasanta	1990
1116	Martis	1987	2445	Pattada	1990
1119	Ittiri	1987	2446	Luras	1990
1120	Bonorva	1987	2447	Oschiri	1990

1529	Usellus	1988	2457	Ploaghe	1991
1532	La Corte	1988	2459	Nulvi	1991
1543	Nule	1988	2465	Mores	1991
1547	Nulvi	1988	2471	Campomela	1991
1562	Fonni	1988	2472	Ittiri	1991
2474	Galtelli	1991	2683	Dorgali	1992
2475	Ovodda	1991	2698	Bolotana	1992
2484	Pattada	1991	2711	Dorgali	1992
2485	Ploaghe	1991	2719	Ploaghe	1992
2488	Tula	1991	2940	Bolotana	1993
2489	Cargeghe	1991	2950	Berchidda	1993
2491	Tula	1991	2954	Arborea	1993
2492	Mores	1991	2959	Arborea	1993
2493	Chiaramonti	1991	2980	Burgos	1993
2498	Nulvi	1991	2988	Montel.Roccad.	1993
2508	Galtelli	1991	3025	Porto Torres	1993
2510	Meana Sardo	1991	3038	Pozzomaggiore	1993
2514	Ossi	1991	3060	Abbasanta	1993
2515	Chiaramonti	1991	3079	Zunchini	1994
2519	Oschiri	1991	3080	Monti	1994
2528	Berchidda	1991	3085	SS	1994
2529	Bancali	1991	3087	Ploaghe	1994
2541	Dorgali	1991	3097	Narbolia	1994
2545	Loceri	1991	3097	Narbolia	1994
2554	Ittireddu	1991	3098	Thiesi	1994
2558	Urzulei	1991	3104	Tula	1994
2562	Bonorva	1991	3105	Buddusò	1994
2572	Porto Torres	1991	3108	Thiesi	1994
2573	Tergu	1991	3119	Sarule	1994
2584	Atzara	1991	3125	Borore	1994
2585	Urzulei	1991	3142	Ittireddu	1994
2587	Palmas/Arborea	1991	3144	Abbasanta	1994
2593	Chiaramonti	1991	3145	Tula	1994
2601	Talana	1991	3146	Calangianus	1994
2607	Berchidda	1991	3177	SS	1994
2616	Putifigari	1991	3178	SS	1994
2640	Porto Torres	1992	3179	Cheremule	1994
2644	Chiaramonti	1992	3415	Tula	1995
2682	Oliena	1992	3416	SS	1995

3417	SS	1995
3418	Berchidda	1995
3421	Ozieri	1995
3423	Sarule	1995
3424	Ozieri	1995
3425	Pattada	1995
3426	Silanus	1995
3427	Fonni	1995
3430	Arbus	1995
3433	Pattada	1995
3434	Mores	1995
3435	Torralba	1995
3436	Ittiri	1995
3438	Ardara	1995
3988	Chiararamonti	1997
3990	Buddusò	1997
3991	Pozzomaggiore	1997
3994	Bonassai	1997
3995	San Giorgio	1997
3997	N.R.	1997
3998	Palmadula	1997
3999	Usini	1997
4000	Puttifigari	1997
4001	Ozieri	1997

N.R.=non riportato

Tabella 1- Isolati di *S. aureus* analizzati in questa ricerca

La localizzazione dei focolai di mastite, dai quali sono stati isolati i ceppi di *S. aureus*, è riportata nella Tabella 2.



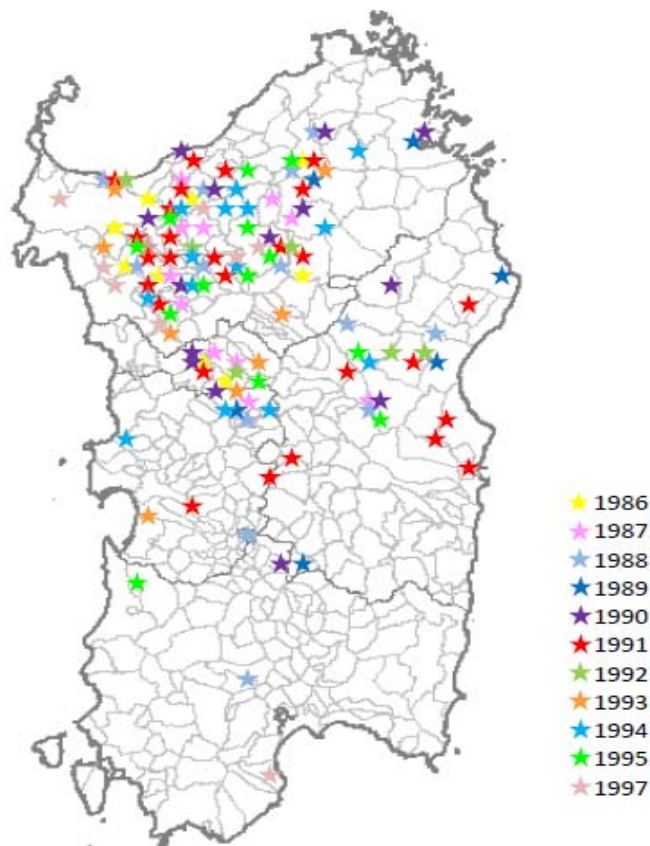


Tabella 2- Localizzazione degli isolati di *S. aureus* analizzati in questa ricerca nel territorio regionale

### Produzione di biofilm (U.O. n° 2)

Per verificare la produzione del biofilm da parte dei 159 isolati di *S. aureus* è stata eseguita una caratterizzazione fenotipica attraverso la semina sul terreno Congo Red Agar (CRA), messo a punto da Freeman *et al.* (1989). Il ceppo di riferimento *S. aureus* RP62A è stato utilizzato come controllo positivo mentre il ceppo di riferimento *S. epidermidis* ATCC 12228 come controllo negativo. Entrambi i ceppi di riferimento sono stati gentilmente forniti dalla Dr.ssa Manuela Oliveira del laboratorio di Microbiologia e Immunologia della Facoltà di Medicina Veterinaria di Lisbona (Portogallo).

Una colonia pura è stata seminata in piastre CRA e incubate a 37° C per 24 ore. Le colonie sono state osservate dopo essere state tenute 24 ore a temperatura ambiente, quindi 48 ore dopo la semina. Su questo terreno le colonie di *S. aureus* assumono diverse colorazioni in base alla produzione del biofilm (Arciola *et al.*, 2002). Le colorazioni che possono assumere sono sei: *very black*, *black* e *almost black* quando il

risultato è considerato positivo, oppure *bordeaux*, *red* e *very red* quando il risultato è considerato negativo.

### **Estrazione del DNA e amplificazione del gene *ica* (U.O. n°2)**

Per l'estrazione del DNA, una colonia dei 159 isolati di *S. aureus* e dei ceppi di referenza (*S. aureus* RP62A e *S. epidermidis* ATCC 12228) è stata seminata in 5 ml di BHI a 37° C in leggera agitazione over/night. Un'aliquota di 100 µl della brodocoltura è stata centrifugata a 7000 rpm per due minuti. Il pellet è stato risospeso in 49,5 µl di H<sub>2</sub>O sterile a cui si aggiungono 0,5 µl di lisostafina 1 mg/ml (Sigma) allo scopo di rompere la parete batterica. Dopo un' incubazione in leggera agitazione a 37° C per 10 minuti, si aggiungono 1 µl di proteinasi K 5 mg/ml (Roche) e 150 µl di TrisHCl 0,1 M a pH 7.5. Dopo un'ulteriore incubazione a 37° C in leggera agitazione per 10 minuti, i campioni sono stati fatti bollire per 5 minuti. Gli estratti sono stati utilizzati immediatamente per la PCR o conservati a -20°C.

La presenza del locus *ica* (*icaA* e *icaD*) e del gene *bap* è stata determinata mediante l'utilizzo dei primers riportati in Tabella 3.

Gene	Sequenza Primers (5'-3')	Prodotto PCR (bp)	Bibliografia
<i>icaA</i>	icaA-F CACGTGCTCTATGCTGGATG icaA-R CCGTTGGATATTGCCTCTGT	502	Vandecasteele <i>et al.</i> , 2003
<i>icaD</i>	icaD-F AAACGTAAGAGAGGTGG icaD-R GGCAATATGATCAAGATAC	381	Vasudevan <i>et al.</i> , 2003
<i>bap</i>	bap-F CCCTATATCGAAGGTGTAGAATTG bap-R GCTGTTGAAGTTAATACTGTACCTGC	978	Cucarella <i>et al.</i> , 2001

Tabella 3- Set di primers per i geni *icaA*, *icaD* e *bap* utilizzati in questa ricerca

Il programma termico per il gene *icaA* prevedeva un ciclo di denaturazione a 94° C per 5 minuti, seguito da 30 cicli di denaturazione a 94°C per 30 sec (45 sec per il gene *icaD*), annealing a 55°C per 60 sec (a 49° per 45 sec per il gene *icaD*) ed una estensione a 72°C per 60 sec. Per il gene *bap*, la temperatura di annealing è stata impostata a 52°C per 1 min. Gli amplificati sono stati esaminati attraverso una corsa elettroforetica su gel di agarosio all' 1% in TAE 1X (0.04 M Tris-acetate, 0.001 M EDTA) contenente 8 µl di Syber safe (Invitrogen, Oregon, US)] per 30 minuti a 100 V. Il gel è stato visualizzato ai raggi UV.

### **Antibiotico resistenza (UU.OO. 1 e 2)**

Per verificare la suscettibilità dei 159 isolati di *S. aureus* a diversi agenti antimicrobici abbiamo utilizzato il metodo di diffusione in piastre di Mueller-Hinton agar in accordo con le linee guida raccomandate dal Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2008). La torbidità dell'inoculo è stato aggiustato allo standard 0.5 McFarland. Sono stati utilizzati i seguenti dischi di antibiotici (Oxoid, Basingstore, England): penicillina (PEN, 10 U.I.), streptomina (S, 10 µg), novobiocina (NV, 30 µg), meticcillina (MET, 5 µg), kanamicina (KAN, 30 µg), gentamicina (GEN, 10 µg),

eritromicina (ERY, 15 µg), trimethoprim-sulfamethoxazole (SXT, 25 µg), cefalotina (CEF, 30 µg), ampicillina (AMP, 10µg), amoxicillina- acid clavulanico (AMC, 30 µg), oxacillina (OXA, 1 µg), tetraciclina (TET, 30 µg) teicoplanina (TEC, 30 µg). I ceppi di riferimento *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC 29213e *S. aureus* ATCC 43300 sono stati utilizzati per il quality control (QC). Gli isolati sono stati classificati come sensibili, intermedi o resistenti in base al diametro della zona d'inibizione utilizzando il valore di breakpoint (mm) indicato dal manuale CLSI e relativo allo *Staphylococcus aureus*. I ceppi resistenti agli antibiotici TET, AMP e ERY sono stati ulteriormente testati per determinare la minima concentrazione inibente (MIC) attraverso le strip M.I.C.Evaluators (Oxoid). Le strip M.I.C.Evaluators, costituite da un gradiente stabilizzato di antibiotico, permettono di valutare la MIC in un intervallo compreso tra 265 µg/ml e 0,015 µg/ml.

### **Spa-typing (U.O. n°2)**

L'amplificazione della regione ripetuta *spa* è stata effettuata utilizzando i primer *spa*-1113-F (5'-AAAGACGATCCTTCGGTGAGC-3') e *spa*-1514-R (5'-CAGCAGTAGTGCCGTTTGCTT-3'), come descritto da Harmsen et al.(2003). Il programma termico prevedeva un ciclo di denaturazione a 94° C per 5 minuti, seguito da 30 cicli di denaturazione a 94°C per 1 min, annealing a 60°C per 1 min e da estensione a 72°C per 45 sec. Gli amplificati sono stati esaminati attraverso una corsa elettroforetica su gel di agarosio all' 1.5% in TAE 1X. I prodotti di PCR sono stati sequenziati dalla BMR Genomics (<http://www.bmr-genomics.it>). Lo *spa* typing è stato determinato utilizzando il database del software on-line Ridom *spa* server (<http://www.spaserver.ridom.de>).

### **Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) (U.O. n°2)**

I 159 isolati di *S. aureus* sono stati messi in coltura in 5 ml di Brain Heart Infusion Broth (BHI, Oxoid) a 37°C per 18 ore. Un'aliquota di ciascuna coltura overnight è stata centrifugata a 4000 rpm per 5 min. Il pellet è stato risospeso in 300 µl di buffer di lisi (6 mM Tris-HCl pH8.0, 1M NaCl, 0.1M EDTA pH8.0, 0.5% Brij 58, 0.2% desossicolato, 0.5% sarkosyl) supplementato con 2µl di lisostafina (Sigma). Dopo l'ulteriore aggiunta di 300 µl di 2% low-melting agarosio (Bio-Rad), tutta la sospensione è stata distribuita in un mold e lasciata solidificare a 4°C. I blocchetti, costituiti da 100 µl di sospensione, sono stati incubati a 37°C per 1 ora in buffer di lisi e per un'altra ora a 55°C in TE Buffer (10 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, pH 8.0). Dopo un ulteriore lavaggio in TE buffer, i blocchetti sono stati conservati a 4°C. Porzioni di ciascun blocchetto (circa 50 µl) sono stati digeriti con 20 U di *Sma*I (Roche) per 4 ore e fatti correre in un gel di agarosio all'1% in TBE buffer (0.1M Tris, 0.1M acido borico, 2 mM EDTA, pH 8.0) a 14°C in un contour-champed homogeneous electric field (CHEF) mapper system (Bio-Rad). Le condizioni elettriche utilizzate sono state: 200 Volts per 20 ore con un range di pulse times compreso tra 4 e 35 sec. I cromosomi del *Saccharomyces cerevisiae* (Bio-Rad) e il Lambda DNA (Sigma) sono stati utilizzati

come markers di riferimento. Dopo la corsa, i gels sono stati colorati con bromuro di etidio, decolorati ed infine fotografati. Il numero e la posizione dei frammenti di DNA, derivati dalla digestione enzimatica sono stati calcolati con BioNumerics software (version 3.0, Applied Maths, Belgium). Il software è stato inoltre utilizzato per calcolare il coefficiente di similarità, per “clusterizzare” i ceppi e generare dendrogrammi.

### Presenza dei geni per le SEs (U.O. n°2)

La presenza dei geni per le tossine SEA, SEB, SEC, SED e SEE è stata determinata con singole PCR. Le amplificazioni sono state effettuate utilizzando i primers riportati in Tabella 4. Master mix da 25 µl contenenti 5µl di estratto batterico e 25 pmoli di ciascun primer sono state amplificate nel termal cycler GeneAmp 9700 dell’Applied Biosystems. Gli amplificati sono stati esaminati attraverso una corsa elettroforetica su gel di agarosio all’ 1.2% in TAE 1X. I controlli positivi di riferimento sono stati: *S. aureus* subsp. *aureus* ATCC 13565 (per il gene *sea*), *S. aureus* subsp. *aureus* ATCC 14458 (per il gene *seb*), *S. aureus* subsp. *aureus* ATCC 19095 (per il gene *sec*), *Staphylococcus spp.* (per il gene *sed*) e *S. aureus* subsp. *aureus* ATCC 27664 (per il gene *see*).

Gene		Sequenza Primers (5'-3')	Prodotto PCR (bp)	Bibliografia
<i>sea</i>	seaF seaR	GCAGGGAACAGTTTTAGGC GTTCTGTAGAAGTATGAAACACG	520	Monday & Bohach (1999)
<i>seb</i>	sebF sebR	ACATGTAATTTGATATTCGCACTG TGCAGGCATCATGTCATACCA	667	Monday & Bohach (1999)
<i>sec</i>	secF secR	CTTGTATGTATGGAGGAATAACAA TGCAGGCATCATATCATACCA	283	Monday & Bohach (1999)
<i>sed</i>	sedF sedR	GTGGTGAAATAGATAGGACTGC ATATGAAGGTGCTCTGTGG	384	Monday & Bohach (1999)
<i>see</i>	seeF seeR	TACCAATTAACCTTGTGGATAGAC CTCTTGCACCTTACCGC	170	Monday & Bohach (1999)

Tabella 4- Set di primers tossina-specifici utilizzati in questa ricerca

### Presenza dei fattori di virulenza (U.O. n°2)

Nei 159 isolati di *S. aureus* è stata analizzata la presenza dei geni per 7 determinanti genetici di virulenza mediante PCR. Nella Tabella 5 sono elencati i geni e i primers utilizzati in questa ricerca. Gli amplificati sono stati esaminati attraverso una corsa elettroforetica su gel di agarosio in TAE 1X.

Gene		Sequenza Primers (5'-3')	Prodotto PCR (bp)	Bibliografia
<i>sdrC</i>	SdrC-F Sdr-R	ACGACTATTAACCAAGAAC GTACTTGAAATAAGCGGTTG	560	Peacock et al., 2002
<i>sdrD</i>	SdrD-F SdrD-R	GGAATAAAGTTGAAGTTTC ACTTTGTCATCAACTGTAAT	500	Peacock et al., 2002
<i>sdrE</i>	SdrE-F SdrE-R	CAGTAAATGTGTCAAAGA TTGACTACCAGCTATATC	767	Peacock et al., 2002
<i>clfA</i>	ClfA-F ClfA-R	GGCTTCAGTGCTTGTAAGG TTTTTCAGGGTCAATATAAGC	1042	Proietti et al., 2010
<i>clfB</i>	<i>ClfB</i> -F <i>ClfB</i> -R	TGCAAGATCAAAGTTCCT TCGGTCTGTAAATAAAGGTA	596	Peacock et al., 2002
<i>fnbA</i>	FnbA-F FnbA-R	CACAACCAGCAAATATAG CTGTGTGGTAATCAATGTC	1362	Peacock et al., 2002
<i>fnbB</i>	FnbB-F FnbB-R	GTAACAGCTAATGGTCAATTGATACT CAAGTTCGATAGGAGTACIATGTTT	524	Vancraeynest et al., 2004
<i>bbp</i>	Bbp-F Bbp-R	CAGTAAATGTGTCAAAGA TACACCCTGTTGAACTG	1050	Peacock et al., 2002
<i>cna</i>	Cna-F Cna-R	GTCAAGCAGTTATTAACACCAGAC AATCAGTAATTGCATTTGTCCACTG	423	Vancraeynest et al., 2004
<i>eno</i>	Eno-F Eno-R	ACGTGCAGCAIGCTGACT CAACAGCATYCTTCAGTACCTTC	302	Vancraeynest et al., 2004
<i>fib</i>	Fib-F Fib-R	CTACAACACTACAATTGCCGTCAACAG GCTCTTGTAAGACCATTTTCTTCAC	404	Vancraeynest et al., 2004

Tabella 5 - Set di primers adesina-specifici utilizzati in questa ricerca

## RISULTATI

### Localizzazione degli isolati di *S. aureus* nel territorio regionale

Dalla mappa riportata in Tabella 2 si evince che gran parte degli isolati di *S. aureus*, collezionati nel periodo 1986-1997, provengono dalla provincia di Sassari.

### Produzione di biofilm

La Tabella 6 mostra i risultati ottenuti in seguito alla semina dei 159 isolati di *S. aureus* in piastre CRA. Tutti gli isolati sono risultati non produttori di biofilm: 133 isolati (corrispondente al 83.6%) hanno presentato una colorazione “bordeaux”, 25 (pari a 15.8%) una colorazione “red” e 1 (pari a 0.6%) una colorazione “very red”. L’analisi in PCR con i set di primers riportati in Tabella 3 conferma l’assenza dei geni *ica* e *bap*.

<b>Congo Red Agar (CRA)</b>	<b>Isolati (n=159)</b>
<b>VERY RED</b> (n=1)	2587
<b>RED</b> (n=25)	905-1002-1003-1042-1062- 1576-1875-1796-2264-2374-2446-2447-2488-2492-2554-2572-2698-3080-3097-3098-3144-3177-3178-3119-3421-
<b>BORDEAUX</b> (n=133)	927-930-1000-1004-1005-1006-1007-1008-1009-1107-1010-1011-1012-1013-1014-1015-1036-1056-1064-1108-1114-1116-1119-1120-1529-1532-1543-1547-1562-1617-1618-1634-1635-1960-2001-2004-2005-2037-2097-2362-2375-2379-2383-2402-2404-2409-2410-2413-2418-2427-2445-2457-2459-2465-2471-2472-2474-2475-2484-2485-2489-2491-2493-2498-2508-2510-2514-2515-2519-2528-2529-2541-2545-2558-2562-2573-2584-2585-2593-2601-2607-2616-2640-2644-2682-2683-2711-2719-2940-2950-2954-2959-2980-2988-3025-3038-3060-3079-3085-3087-3104-3105-3179-3125-3142-3145-3146-3415-3416-3417-3418-3423-3424-3425-3426-3427-3430-3433-3434-3435-3436-3438-3988-3994-3995-3998-3997-3990-3991-3999-4000-4001

Tabella 6-Caratterizzazione fenotipica degli isolati di *S. aureus* in Congo Red Agar

### Suscettibilità antimicrobica

La suscettibilità antimicrobica degli isolati di *S. aureus* è riassunta nella Tabella 7. Dalla tabella si evince che 122 isolati (corrispondente a 76.7%) sono risultati sensibili a tutti gli agenti antimicrobici analizzati.

Tabella 7- Resistenza antimicrobica degli isolati di *S.aureus* collezionati nel periodo 1986-1997

<b>Resistenti:</b>	<b>Isolati</b>
<b>S</b> (n=2)	1796-2447
<b>AMP/ PEN</b> (n=1)	2683
<b>KAN</b> (n=1)	930
<b>Intermedi:</b>	
<b>S</b> (n=33)	905-927-1529-1543-1547-1562-1576-1617-1635-2004-2005-2409-2573-2980-3038-3098-3108-3119-3125-3144-3145-3415-3416-3417-3421-3423-3424-3425-3426-3430-3433-3435-3436

Abbreviazione degli antibiotici: S (streptomicina), AMP/PEN (ampicillina/penicillina), KAN (kanamicina)

### Presenza dei geni *se*

La frequenza dei geni *se* negli isolati di *S. aureus* è riportata nella Tabella 8. Su 159 isolati analizzati, 130 (81.7%) sono risultati positivi a uno o più geni *se*. Il gene maggiormente riscontrato è stato il gene *sec* (n=71, pari al 44.65%); solo 1 isolato ha presentato il gene *seb*. La combinazione *seb-sec* è stata riscontrata in 58 isolati (36.5%). In 29 isolati (18.2%) non è stata riscontrata nessuna amplificazione riferibile ai geni analizzati.

<b>Geni <i>se</i></b>	<b>Isolati</b>
<i>sea</i>	-
<i>seb</i>	1
<i>sec</i>	71
<i>sed</i>	-
<i>see</i>	-
<i>seb-sec</i>	58
<i>not detected</i>	29

Tabella 8- Prevalenza dei geni *se* negli isolati di *S. aureus*

### Presenza dei geni per i fattori di virulenza

La frequenza dei geni associati alla virulenza è riportata nella Tabella 9.

<b>Adesine</b>	<b>Isolati</b>
<i>sdrC</i>	131
<i>sdrD</i>	7
<i>sdrE</i>	117
<i>clfA</i>	116
<i>clfB</i>	128
<i>fnbA</i>	117
<i>fnbB</i>	3
<i>bbp</i>	2
<i>cna</i>	24
<i>eno</i>	137
<i>fib</i>	139

Tabella 9- Prevalenza dei geni per i fattori di virulenza negli isolati di *S. aureus*

### Spa typing

La Tabella 10 riepiloga gli *spa types* riscontrati in Sardegna: 114 isolati (71.7%) appartengono al t1773, 20 (12.5%) al t3626, 7 (4.4%) al t7754, 7 (4.4%) al

t1403, 5 (3.1%) al t524 e 2 (1.2%) al t528. Nella Tabella 11 è riportata la distribuzione dei diversi *spa* types nel territorio regionale.

<b>Types</b>	<b>Isolati (n=159)</b>
<b>t1773</b> (n=114)	905-930-1002-1003-1004-1005-1006-1007-1008-1010-1012-1014-1015-1036-1056-1062-1064-1108-1114-1119-1120-1529-1532-1547-1562-1617-1618-1634-1635-1796-2001-2005-2037-2097-2383-2402-2413-2418-2427-2445-2457-2459-2471-2472-2474-2475-2484-2489-2491-2492-2498-2508-2510-2514-2519-2528-2529-2545-2554-2558-2562-2572-2573-2584-2587-2640-2644-2682-2683-2698-2719-2940-2950-2959-2980-3025-3038-3060-3079-3080-3085-3087-3104-3105-3108-3125-3142-3144-3145-3146-3177-3179-3415-3416-3418-3423-3424-3425-3426-3427-3430-3433-3434-3435-3436-3438-3990-3991-3994-3995-3997-3998-3999-4000
<b>t3626</b> (n=20)	1042-1543-1576-1960-2004-2409-2465-2485-2488-2593-2607-2616-2711-2954-3097-3098-3178-3417-3421-4001
<b>t7754</b> (n=7)	927-1009-1011-1013-1107-2515-3988
<b>t1403</b> (n=7)	2264-2362-2374-2375-2379-2446-2988
<b>t524</b> (n=5)	1116-1875-2541-2585-2601
<b>t3571</b> (n=4)	1000-2404-2410-2493
<b>t528</b> (n=2)	2447-3119

Tabella 10- Gli *spa* types riscontrati in Sardegna



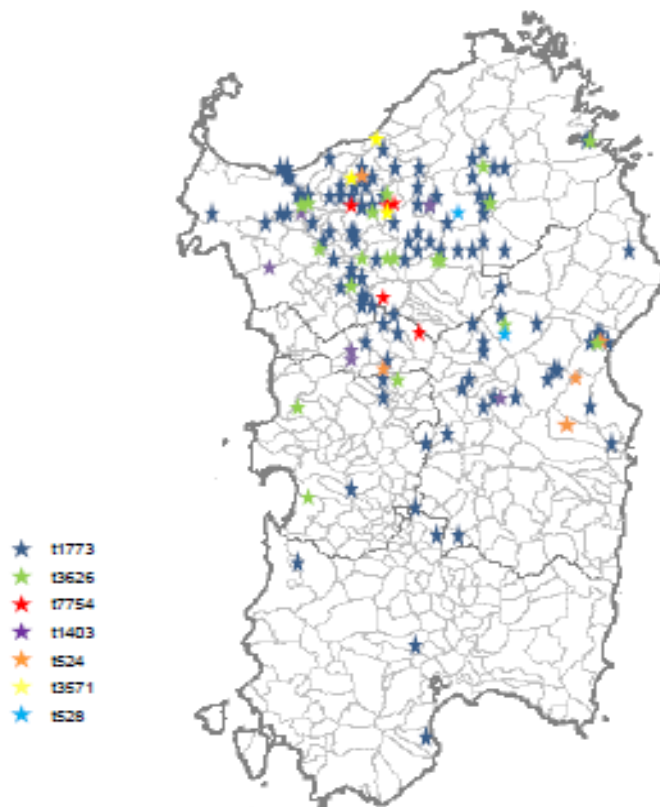


Tabella 11- Distribuzione degli *spa* types nel territorio regionale

### Pulsed Field Gel Electrophoresis

La variabilità genomica dei 159 isolati di *S. aureus* ottenuta applicando la tecnica di PFGE è riportata nella Tabella 12. Utilizzando il 75% di similarità, sono stati assegnati 9 distinti clusters, da A a I. Il cluster A raggruppa 6 pulsotipi diversi, il cluster B ne raggruppa 7, 3 il cluster C, 7 il cluster D, 2 il cluster E, 22 il cluster F, 2 il cluster G, 16 il cluster H e 4 il cluster I. Con il 75% di similarità 2 isolati non rientrano in nessuno di questi clusters.

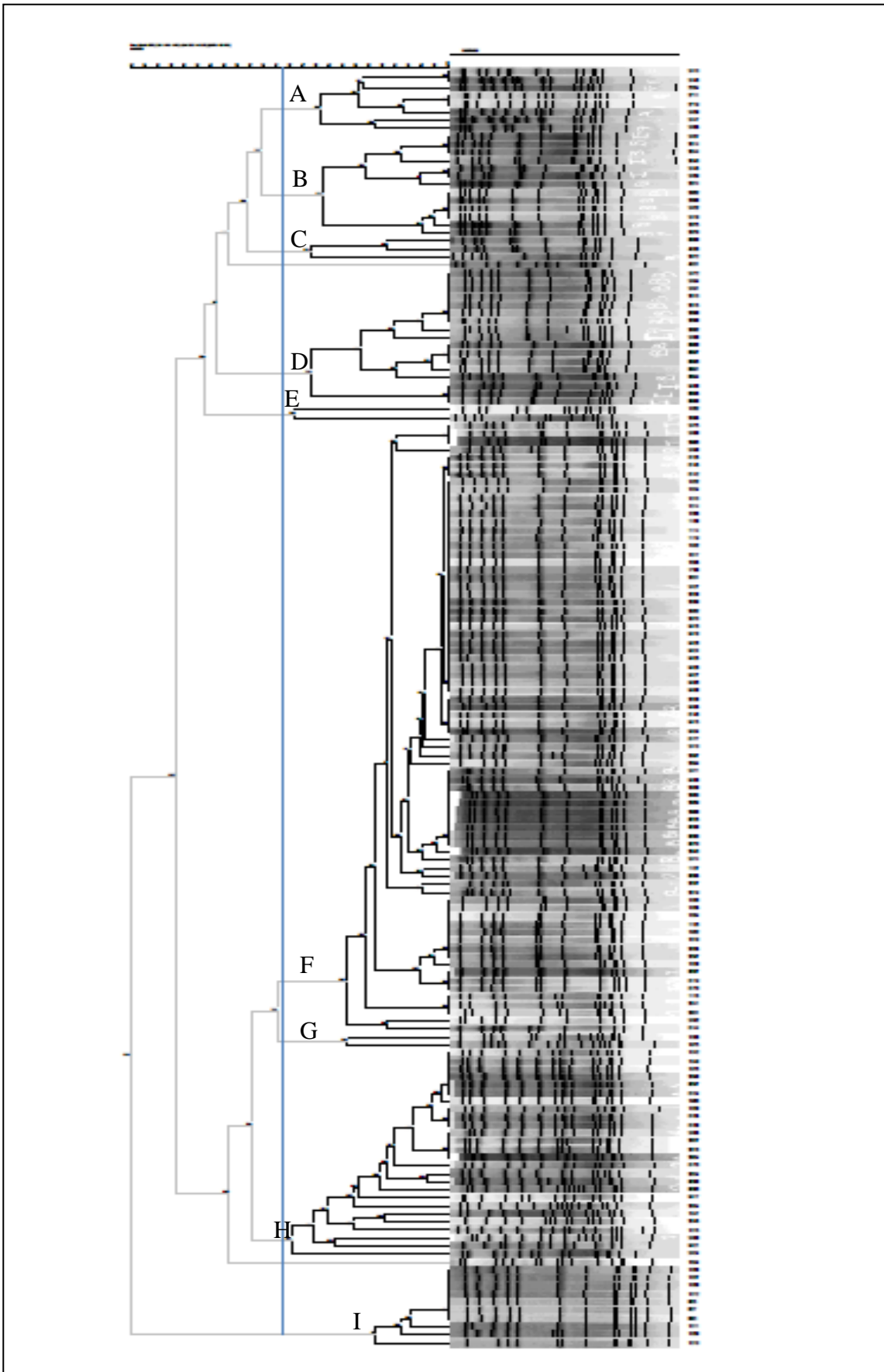


Tabella 12- Dendrogramma derivato dai profili ottenuti con la PFGE dei 159 isolati di *S. aureus*

## DISCUSSIONE

La virulenza dello *S. aureus* è associata alla sua capacità di produrre tossine e altri fattori extracellulari, alla sua capacità di aderire alla superficie dell'ospite, alla formazione di biofilm e alla resistenza alla fagocitosi (Takeuchi et al., 2001). La capacità dello *S. aureus* di formare biofilm ne determina la sopravvivenza in ambienti ostili aumentando la possibilità di infezioni croniche o persistenti (Costerton et al., 1999). Da molteplici studi condotti su ceppi di *S. aureus* isolati da infezioni nosocomiali, si è visto che la produzione di slime e biofilm è associata alla presenza del cluster genico *icaADBC* (Ziebuhr et al., 1997; Arciola et al., 2001). In ceppi di *S. aureus* isolati da mastite bovina, Cucarella et al. (2001) hanno identificato la presenza della proteina di superficie Bap (biofilm associated protein) implicata nella formazione del biofilm. Baselga et al. (1993) hanno osservato che la gravità delle mastiti diminuisce quando l'infezione è causata da *S. aureus* produttori di slime (con presenza dei geni *ica* e/o *bap*) anche se aumenta la capacità di questi batteri di colonizzare la ghiandola mammaria. Il fatto che i ceppi di *S. aureus* produttori di slime inducano infezioni più blande e una minore alterazione del numero delle cellule somatiche, porta a sottostimare le mastiti e conseguentemente a non approntare un intervento immediato sugli animali infetti (Cucarella et al., 2004). Recentemente sono stati pubblicati molti lavori concernenti la produzione di biofilm da parte di *S. aureus* responsabili di mastite bovina (Vasudevan et al., 2003; Ciftci et al., 2009; Dhanawade et al., 2010). Tuttavia nessun lavoro ha riguardato la produzione di biofilm da parte di *S. aureus* responsabili di mastite ovina. L'analisi fenotipica con il metodo CRA e l'analisi genotipica del locus *ica* hanno evidenziato l'assenza di colonie *almost black*, *black* e *very black* e l'assenza dei geni *icaA*, *icaD* e *bap* nei 159 isolati di *S. aureus* collezionati nel periodo 1986-1997.

Una piccola percentuale (2.5%) di isolati di *S. aureus* sono risultati resistenti agli antibiotici testati. Una percentuale maggiore (20.7%) ha presentato valori intermedi di resistenza alla streptomina. In questo lavoro non è stato possibile comparare i dati ottenuti con altri presenti in letteratura in quanto i molti studi di valutazione della resistenza antimicrobica di isolati clinici riguardano altre specie animali ma non quella ovina (De Oliveira et al., 2000; Vancraeynest et al., 2004; Haftu et al., 2012). Il dato importante emerso da questo studio è l'assenza di isolati resistenti alla meticillina (MRSA), come evidenziato anche da Porrero et al. (2012) negli isolati raccolti nella Spagna centrale.

L'81.7% degli isolati di *S. aureus* della nostra collezione è provvisto dei geni SE. Con il metodo PCR, 71/159 isolati sono risultati potenzialmente produttori di *sec*, mentre in 58/159 isolati sono stati riscontrati i geni codificanti *sec* e *seb*. Un'alta percentuale di presenza del gene *sec* è stata riscontrata anche nei ceppi di *S. aureus* isolati da pecore con mastite gangrenosa collezionati in Turchia (Tel et al., 2011).

In questo lavoro abbiamo analizzato la diversità clonale di 159 isolati di *S. aureus* mediante PFGE e *spa* typing. Entrambe le tecniche hanno evidenziato una considerevole diversità clonale anche se con lo *spa* typing si è visto che in Sardegna predomina il t1773.

## BIBLIOGRAFIA

- Aguilar B., Amorena B., Iturralde M.** (2001). Effect of slime on adherence of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine and ovine mastitis. *Vet. Microbiol.* **78**:183-191.
- Arciola C.R., Baldassarri I., Montanaro L.** (2001). Presence of *icaA* and *icaD* genes and slime production in a collection of staphylococcal strains from catheter-associated infections. *J. Clin. Microbiol.* **39**:2151-2156.
- Baselga R., Albizu I., De La Cruz M., Del Cacho E., Barberan M., Amorena B.** (1993). Phase variation of slime production in *Staphylococcus aureus*: implications in colonization and virulence. *Infect Immun.* **61**: 4857-4862
- Cifrian E., Guidry A.J., O'Brien C.N., Nickerson S.C., Marquardt W.W.** (1994). Adherence of *Staphylococcus aureus* to cultured bovine mammary epithelial cells. *J. Dairy Sci.* **77**:970-983.
- Ciftci A., Onuk E.E., Savasan S.** (2009). Detection of methicillin resistance and slime factor production of *Staphylococcus aureus* in bovine mastitis. *Braz. J. Microbiol.* **40**:254-261.
- Clutterbuck A.L., Woods E.J., Knottenbelt D.C., Clegg P.D., Cochrane C.A., Percival S.L.** (2007). Biofilms and their relevance to veterinary medicine. *Vet. Microbiol.* **121**:1-17.
- Costerton J.W., Stewart P.S., Greenberg E.P.** (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* **284**: 1318-1322.
- Cramton S.E., Gerke C., Schnell N.F., Nichols W.W., Gotz F.** (1999). The intercellular adhesion (*ica*) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation. *Infect. Immun.* **67**:5427-5433.
- Cucarella C., Solano C., Valle J., Amorena B., Lasa I., Penades J.R.** (2001). Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. *J. Bacteriol.* **183**:2888-2896.
- Cucarella C., Tormo M.A., Ubeda C., Trotonda M.P., Monzon M., Peris C., Amorena B., Lasa I., Penades J.R.** (2004). Role of biofilm-associated protein Bap in the pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* **72**:2177-2185.
- De Oliveira A.P., Watts J.L., Salmon S.A., Aarestrup F.M.** (2000). Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Europe and the United States. *J. Dairy Sci.* **83**:855-862.
- Dhanawade N.B., Kalorey D.R., Srinivasan R., Barbuddhe S.B., Kurkure N.V.** (2010). Detection of intercellular adhesion genes and biofilm production in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis. *Vet. Res. Commun.* **34**:81-89.
- Fox L.K., Zadoks R.N., Gaskins C.T.** (2005). Biofilm production by *Staphylococcus aureus* associated with intramammary infection. *Vet. Microbiol.* **107**:295-299.
- Gerke C., Kraft A., Sussmuth R., Schweitzer O., Gotz F.** (1998). Characterization of the *N*-acetylglucosaminyltransferase activity involved in the biosynthesis of the *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin. *J. Biol. Chem.* **273**:18586-18593.
- Haftu R., Taddele H., Gugsu G., Kalayou S.** (2012). Prevalence, bacterial causes, and antimicrobial susceptibility profile of mastitis isolates from cows in large-scale dairy farms of Northern Ethiopia. *Trop. Anim. Health and Prod.* **44**:1765-1771.
- Mack D., Haeder M., Siemssen N., Laufs R.** (1996). Association of biofilm production of coagulase-negative staphylococci with expression of a specific polysaccharide intercellular adhesion. *J. Infect. Dis.* **174**:881-884.
- Maira-Litran T., Kropec A., Abeygunawardana C., Joyce J., Mark G., Goldmann D.A., Pier G.B.** (2002). Immunochemical properties of the staphylococcal poly-*N*-acetylglucosamine surface polysaccharide. *Infect. Immun.* **70**:4433-4440.
- McKenney D., Hubner J., Muller E., Wang Y., Goldmann D.A., Pier G.B.** (1998). The *ica* locus of *Staphylococcus epidermidis* encodes production of the capsular polysaccharide/adhesion. *Infect. Immun.* **66**, 4711-4720.
- Melchior M.B., Vaarkamp H., Fink-Gremmels J.** (2006b). Biofilms: a role in recurrent mastitis infections? *Vet. J.* **171**:398-407.
- Porrero M.C., Hasman H., Vela A.I., Fernandez-Garayzabal J.F., Dominguez L., Aarestrup F.M.** (2012). Clonal diversity of *Staphylococcus aureus* originating from the small ruminants goats and sheep. *Vet. Microbiol.* **156**:157-161.
- Takeuchi S., Maeda T., Hashimoto N., Imaizumi I.K., Kaidoh T., Hayakawa Y.** (2001). Variation of the *agr* locus in *Staphylococcus aureus* isolates from cows with mastitis. *Vet. Microbiol.* **79**:267-274.
- Tel O.Y., Aslantas O., Keskin O., Yilmaz E.S., Demir C.** (2011). Investigation of toxin genes of *Staphylococcus aureus* from gangrenous mastitis in ewes. *Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg.* **17**:869-871.

- Vancraeynest D., Hermans K., Martel A., Vanechoutte M., Devriese L.A., Haesebrouck F.** (2004). Antimicrobial resistance and resistance genes in *Staphylococcus aureus* strains from rabbits. *Vet. Microbiol.* **101**:245-251.
- Vasudevan P., Nair M.K.M, Annamalai T., Venkitanarayanan K.S.** (2003). Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation. *Vet. Microbiol.* **92**:179-185.
- Ziebuhr W., Krimmer V., Rachid S., Lossner I., Gotz F., Hacker J.** (1999). A novel mechanism of phase variation of virulence in *Staphylococcus epidermidis*: evidence for control of the polysaccharide intercellular adhesion synthesis by alternating insertion and excision of the insertion sequence element IS256. *Mol. Microbiol.* **32**:345-356