

RICERCA DI ENTEROTOSSINE STAFILOCOCCICHE E GENI CODIFICANTI DA *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ISOLATI DA LATTE E FORMAGGI DELLA REGIONE LAZIO

Carfora V., Marri N., Sagrafoli D., Boselli C., Giacinti G., Patriarca D., Pietrini P., Giangolini G., Amatiste S.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana

Centro di Referenza Nazionale per la Qualità del Latte e dei Prodotti Derivati degli Ovini e dei Caprini

simonetta.amatiste@izslt.it

INTRODUZIONE

S. aureus produce un'ampia varietà di tossine, tra cui le SEs, enterotossine con attività emetica già dimostrata (SEA-SEB-SEC-SED-SEE-SEG-SEH-SEI-SER-SES-SET), le "enterotoxin like proteins" (SEIs) il cui effetto emetico non è stato dimostrato nei primati (SEIL e SEIQ) e infine quelle la cui attività emetica deve essere ancora testata (SEIJ, SEIK, da SEIM a SEIP, SEIU, SEIU2 e SEIV). Tutte posseggono attività superantigenica e i rispettivi geni codificanti possono essere localizzati in elementi genetici accessori (profagi, plasmidi, isole genomiche vSa, isole di patogenicità). E' riportato in letteratura che l'identificazione delle SEs potrebbe essere utilizzata per studiare l'origine dei ceppi di *S. aureus* (umana o animale).

Scopo di tale lavoro è stato quello di eseguire un'analisi conoscitiva sulla presenza di geni codificanti SEs/SEIs mediante Multiplex-PCR (M-PCR) in ceppi di *S. aureus* isolati da latte e prodotti lattiero-caseari provenienti da 20 aziende localizzate nella regione Lazio e di confrontare tali risultati con quelli ottenuti mediante test di agglutinazione passiva inversa al lattice (RPLA), per la valutazione delle tossine effettivamente prodotte.

MATERIALI E METODI

Nel corso degli anni 2011, 2012 e parte del 2013 sono state selezionate 169 colonie di stafilococchi coagulasi positivi (48 di origine bovina, 38 caprina, 76 ovina, 5 asinina e 2 ceppi isolati da formaggio di tipologia mista) provenienti da campioni di latte (crudo e termizzato) e varie tipologie di prodotti lattiero-caseari (formaggi freschi, stagionati e a pasta filata). Le suddette colonie sono state sottoposte alle seguenti prove di identificazione per *S. aureus*: colorazione di Gram, test della catalasi e PCR. I ceppi batterici identificati come *S. aureus* sono stati sottoposti a M-PCR per il rilevamento dei geni codificanti SEs/SEIs. Sugli isolati positivi alla presenza dei geni *sea*, *seb*, *sec* e *sed* è stata determinata l'espressione in vitro delle enterotossine A, B, C, D mediante kit SET-RPLA.

RISULTATI

169 colonie di stafilococchi coagulasi positivi selezionate sono state identificate come *S. aureus* mediante test fenotipici e PCR. Nella tabella 1 è riportato il numero degli isolati positivi a *sea*, *seb*, *sec*, *sed* e la relativa produzione e identificazione delle tossine SEs mediante SET-RPLA (SEA-SED): di 41 ceppi in cui è stata rilevata la presenza di *sea-seb-sec-sed*, 25 si sono confermati produttori di tossine (61.0%). Questo dato conferma come la presenza di ceppi che presentano geni codificanti la tossina, non sempre si affianca alla produzione della tossina stessa.



RPLA / M-PCR	N° ISOLATI POSITIVI RPLA / PCR (%)
SEA/Sea	2/4 (50.0%)
SEB/Seb	2/2 (100%)
SEC/Sec	17/26 (65.4%)
SED/Sed	4/9 (44.4%)
Totale	25/41 (61.0%)

Tab. 1 - Isolati batterici positivi alla presenza di geni codificanti *sea-sed* mediante M-PCR e relativa produzione della tossina mediante SET-RPLA

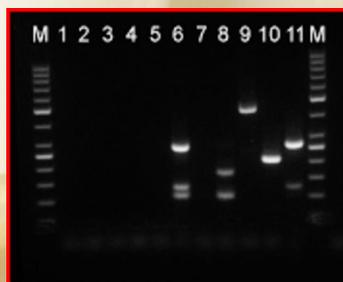


Fig. 1 – Multiplex PCR per *sea-sec* e *ser*. Lanes 1-5: isolati di origine ovina negativi; Lane 6: isolato di origine bovina (positivo per *sea*, *seb* e *ser*); Lane 7: controllo negativo; Lane 8: DNA di *S. aureus* FRIS6; Lane 9: DNA di *S. aureus* FRI137; Lane 10: DNA di *S. aureus* FRI326; Lane 11: DNA di *S. aureus* HMPL280; M, GeneRuler™ 50 bp DNA Ladder (Fermentas)

- *S. aureus* FRIS6: controllo positivo per *sea* (102 bp), *seb* (164 bp)
- *S. aureus* FRI137: controllo positivo per *sec* (451 bp)
- *S. aureus* FRI326: controllo positivo per *see* (213 bp)
- *S. aureus* HMPL280: controllo positivo per *ser* (123 bp), *sed* (278 bp)

Nella tabella 2 sono riportati gli isolati batterici positivi ai geni codificanti SEs/SEIs (*sea-ser*) rilevati tramite M-PCR (Figura 1) in relazione all'origine dei campioni, è stato osservato:

❖ eterogeneità tra i profili dei geni codificanti SEs: 10 combinazioni geniche diverse.

❖ *sea*, prevalentemente rilevato in isolati di origine caprina, è stato il gene più frequentemente riscontrato (46.0%) sui 50 isolati positivi a geni codificanti SEs.

❖ Tra le nuove tipologie di geni codificanti SEs/SEIs quelle maggiormente riscontrate sono risultate *seg* (7.1%) spesso associata a *sei* (4.1%), *seb* (2.9%) e *sej* (4.1%) sempre associata a *sed*. Una elevata prevalenza di ceppi positivi ai geni *seg-sej* è stata riscontrata anche da altri Autori.

M-PCR	N° Ceppi	bovino	ovino	caprino	asinino	misto
<i>adj</i>	1	1	0	0	0	0
<i>adr</i>	2	2	0	0	0	0
<i>adrj</i>	1	1	0	0	0	0
<i>bc</i>	2	0	0	2	0	0
<i>c</i>	23	1	9	11	0	2
<i>cgi</i>	1	0	1	0	0	0
<i>dj</i>	5	5	0	0	0	0
<i>g</i>	5	0	0	5	0	0
<i>gi</i>	5	5	0	0	0	0
<i>h</i>	5	0	5	0	0	0
POS	50	15	15	18	0	2
NEG	119	33	61	20	5	0
TOTALE	169	48	76	38	5	2

Tab. 2 – isolati positivi e negativi alla presenza di geni SEs/SEIs (*sea-ser*) in relazione all'origine dei campioni

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

❖ Buona correlazione tra la presenza di geni codificanti SEs e la produzione delle tossine corrispondenti.

❖ Affiancamento dei metodi biomolecolari ad altri metodi per ottenere informazioni sull'espressione dei geni codificanti SEs/SEIs.

❖ Approfondimenti necessari per chiarire la correlazione tra gli altri geni codificanti SEs/SEIs e le tossine prodotte e il ruolo che queste svolgono nella genesi delle intossicazioni alimentari da stafilococco (SFPs).

❖ La presenza in latte e formaggi di *S. aureus* produttori di SEs di origine animale, suggerisce di prestare particolare attenzione al management igienico-sanitario degli animali in allevamento, in modo da ridurre le mastiti subcliniche, che spesso costituiscono la causa più frequente di contaminazione del latte.