

IDENTIFICAZIONE MEDIANTE PCR DEI PLASMIDI DI VIRULENZA DI *RHODOCOCCUS EQUI* ISOLATI DA CAVALLI IN ITALIA

PCR IDENTIFICATION OF THE VIRULENCE PLASMIDS OF *RHODOCOCCUS EQUI* ISOLATED FROM HORSES IN ITALY

Cuteri V, Romero Tejada A, Splendiani F, Valente C¹, Preziuso S *Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università di Camerino, Matelica (MC); ¹Dipartimento di Patologia Diagnostica e Clinica Veterinaria, Università di Perugia, Perugia*

Parole chiave: *Rhodococcus equi*, cavallo, polymerase chain reaction (PCR), *choE*, vapA, vapB
Key words: *Rhodococcus equi*, horse, polymerase chain reaction (PCR), *choE*, vapA, vapB

SUMMARY – In order to verify the presence of the virulence plasmids vapA and vapB in *Rhodococcus equi* strains isolated from horses in Italy, PCR on 21 *R. equi* strains and on 18 tracheal washes were carried out. The *choE* sequence specific for *R. equi* was found in all 21 strains and in 8 tracheal wash samples. VapA sequence was detected in 20 samples, while no vapB positive samples were detected. In this first Italian report the results about vapA presence in *R. equi* strains are concordant with the data published so far. PCR is a recommendable method for rapid detection of *R. equi* strains and of virulence plasmids. Further studies are required to clarify the role of vapA-vapB negative strains in symptomatic foals.

INTRODUZIONE – *Rhodococcus equi* è un batterio Gram positivo intracellulare, coccobastoncellare, responsabile di polmoniti, enteriti e, meno frequentemente, artrite ed osteomielite nei puledri. Lesioni simil-tubercolari conseguenti ad infezione da *R. equi* sono state evidenziate nei linfonodi, prevalentemente sub-mandibolari, di bovini e suini, mentre l'infezione in altre specie animali è considerata rara. Sempre più frequentemente vengono registrate forme, talvolta letali, di polmonite o di altre infiammazioni suppurative in pazienti umani immunocompromessi (1). *R. equi* è molto resistente ed è diffuso nel terreno e nell'ambiente in molti Paesi, prevalentemente in zone con forte presenza di animali erbivori che, in età adulta, possono ospitare il batterio nell'intestino senza mostrare alcun segno di malattia. E' stato dimostrato che non tutti i ceppi di *R. equi* sono responsabili di malattia nel puledro, infatti sono stati identificati dei plasmidi di virulenza di diverso peso molecolare che, quando presenti, condizionerebbero la patogenicità di *R. equi*. Questi plasmidi, definiti vapA e vapB, sono stati entrambi evidenziati in *R. equi* responsabile di gravi infezioni in pazienti immunocompromessi, mentre negli animali la loro distribuzione sembra essere influenzata dalla specie ospite. In particolare, il plasmide vapA è stato evidenziato in *R. equi* isolati da cavallo, mentre vapB è stato rilevato in ceppi isolati da suino. In base ai risultati di studi sperimentali, i ceppi che possiedono vapA sono stati definiti "ad alta virulenza", quelli con vapB "a virulenza intermedia" e quelli privi di vapA e vapB "non virulenti" (2). Le ricerche finalizzate all'identificazione dei plasmidi di virulenza in *R. equi* isolati dagli animali sono piuttosto limitate sia nel nostro Paese che in Europa.

L'obiettivo di questo studio è stato quello di valutare la presenza dei plasmidi di virulenza vapA e vapB in ceppi di *R. equi* isolati da cavalli con sintomi respiratori in Italia.

MATERIALI E METODI – Sono stati esaminati 21 ceppi di *R. equi* isolati durante l'attività diagnostica e conservati in collezione. I batteri provenivano da aspirati tracheali di puledri con sintomi respiratori riconducibili ad infezione da *R. equi* ed appartenenti ad allevamenti del Centro e Nord Italia in cui era stata dimostrata una elevata prevalenza sierologica ed in cui in passato si erano manifestati casi di infezione da *R. equi*. Sono stati inoltre inclusi nello studio 18 aspirati tracheali pervenuti al laboratorio di Malattie Infettive, UNICAM, per la ricerca di *R. equi*. I campioni di aspirato tracheale sono stati sottoposti ad esame batteriologico e, analogamente ai ceppi in collezione, ad indagini di PCR per l'individuazione della sequenza *choE* di *R. equi* e delle sequenze dei plasmidi vapA e vapB.

I ceppi in collezione, conservati in Cryobank (DID, Milano, Italy), sono stati incubati 10-12 ore in TSB (Oxoid, Milano), seminati su Muller-Hinton (Oxoid, Milano) e incubati a 30°C per 48 h. I campioni di aspirato tracheale sono stati seminati su terreno NANAT posto in incubazione a

30°C per 48-72h. Le colonie riconducibili a *R. equi* sono state trapiantate e processate per l'identificazione biochimica mediante API Coryne (Biomérieux, France).

Per le analisi con PCR, il DNA è stato estratto sia dalle colonie batteriche che dai campioni di aspirato tracheale. Tre colonie ottenute in purezza sono state sospese in 50 µl di buffer di lisi contenente lisozima e quindi trattate con proteinasi K, come descritto precedentemente (3), prolungando i tempi di incubazione con lisozima e con proteinasi K a 90 minuti ciascuno. Inoltre, il pellet ottenuto dalla centrifugazione di 2 ml di aspirato tracheale è stato sospeso in 4 ml di TSB ed incubato a 30°C. Dopo 10-12 ore, il pellet ottenuto da 1,5 ml di brodo è stato trattato con lisozima e proteinasi K come sopra descritto.

Per l'evidenziazione della sequenza *choE*, che codifica per l'enzima colesterolo esterasi di *R. equi*, sono stati utilizzati i primer COX-F e COX-R (4). Per la ricerca delle sequenze dei plasmidi *vapA* e *vapB* sono stati utilizzati i primer 1-2 e 3-4 precedentemente descritti (5). Le reazioni sono state effettuate in un volume finale di 25 µl contenente 12,5 µl di mastermix (Taq PCR mastermix, Qiagen, Hilden, Germany), 10 pmol di ogni primer (Operon Biotechnologies, Cologne, Germany) e 3 µl di DNA estratto. Il protocollo di amplificazione consisteva in: 5 min. a 95°C, 35 x [30 sec. a 95°C, 30 sec. a 59°C per *choE* o a 55°C per *vapA* e *vapB*, 40 sec. a 72°C], 7 min. a 72°C. Per ogni PCR veniva impiegato un controllo positivo per *vapA* e *vapB* (ceppi forniti dal prof. S. Takai, Kitasato University, Japan).

RISULTATI – L'esame batteriologico condotto sugli aspirati tracheali ha consentito di isolare *R. equi* in 9 dei 18 campioni, 7 dei quali sono risultati positivi alla PCR per *choE*. La ripetizione dei test di identificazione biochimica sui 2 campioni discordanti ha classificato il germe isolato come *Brevibacterium spp.*, dato confermato dalla successiva PCR per la sequenza 16SrRNA di *Brevibacterium spp.* (6). Nove campioni sono risultati negativi all'esame batteriologico, ma uno di questi è risultato positivo alla PCR per *choE*. Tutti i 21 ceppi conservati in collezione sono risultati positivi alla PCR per *choE*. In 20 dei 29 campioni (69%) positivi alla PCR per *choE* è stata rilevata la sequenza di *vapA*, mentre nessun caso è risultato positivo per *vapB*.

DISCUSSIONE – Sebbene l'indagine, sia stata effettuata su un numero piuttosto contenuto di ceppi, i risultati ottenuti concordano con quanto finora riportato in bibliografia. Infatti un'alta percentuale di *R. equi* isolati da cavalli con sintomi respiratori presentava il plasmide *vapA*, mentre in nessun caso è stato evidenziato *vapB*. Essendo stato dimostrato sperimentalmente che l'asportazione dei plasmidi *vapA* e *vapB* rende *R. equi* incapace di sopravvivere e replicare nei macrofagi e quindi di esplicare il proprio potere patogeno (1), per chiarire il ruolo dei ceppi privi di *vapA* e *vapB* in puledri con sintomi respiratori dovranno essere presi in considerazione altri meccanismi patogenetici.

L'esame batteriologico rappresenta il *gold standard* per la diagnosi di infezione da *R. equi*, e permette inoltre la valutazione di alcune caratteristiche importanti, come ad esempio la resistenza agli antibiotici. Tuttavia questo metodo richiede almeno 3-4 giorni per essere completato e può presentare alcune limitazioni di sensibilità e specificità. L'esame diretto con PCR dai campioni di lavaggio tracheale previo pre-arricchimento in brodo rappresenta un metodo rapido, sensibile e specifico per l'identificazione di *R. equi*. Inoltre la PCR sul DNA estratto dalle colonie o direttamente dal campione costituisce, al momento, il metodo più valido per l'evidenziazione dei plasmidi *vapA* e *vapB*. L'associazione dei due metodi diagnostici, screening preliminare con *choE*-PCR e successivo isolamento batterico e ricerca dei plasmidi di virulenza dai campioni *choE*-positivi, potrebbe permettere la precoce individuazione degli animali infetti, un'indagine epidemiologica completa e l'adozione di misure idonee a prevenire l'infezione nei puledri.

BIBLIOGRAFIA – (1) Meijer WG, Prescott JF (2004) Vet Res, 35, 383-396; (2) Takai S et al (1996) J Clin Microbiol, 34, 1034-7; (3) Preziuso S et al (2006) S.I.S.Vet, LX, 159-60; (4) Ladron N et al (2003) J Clin Microbiol, 41, 3241-5; (5) Takai S et al (2004) J Vet Med Sci, 66, 743-6; (6) Gelsomino R et al (2004) Lett Appl Microbiol, 38, 532-5;