

## PFGE E MALDI TOF A CONFRONTO NELLO STUDIO DELLA SPONDILITE DA *ENTEROCOCCUS CECORUM* DEL BROILER

Drigo I., Pascoletti S., Bacchin C., Berto G., Brunetta R., Agnoletti F., Viel L., Guolo A., Marcon B., Bano L.

Laboratorio di Batteriologia Speciale, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Villorba, Treviso

### Summary

*Enterococcus cecorum* has recently emerged as an important cause of osteomyelitis in chickens. 27 *Enterococcus cecorum* strains isolated from meat chickens, 3 from laying hens, 2 from calves and 1 from duck were characterized by PFGE and MALDI TOF MS. PFGE results revealed that clinical strains isolated from the same flock and the same bird were clonal or genetically strongly related. The PFGE showed a higher discriminating power compared with the MALDI TOF.

### INTRODUZIONE

*Enterococcus cecorum* (inizialmente conosciuto come *Streptococcus cecorum*) è un cocco Gram positivo anaerobio facoltativo, catalasi negativo e  $\alpha$ -emolitico. Sebbene *E. cecorum* sia un normale commensale della flora intestinale degli uccelli, è considerato un patogeno emergente del pollo da carne in quanto è stato associato a spondilite, osteomielite, artriti e setticemia. La spondilite è un'infiammazione vertebrale che è stata osservata soprattutto in soggetti maschi di età superiore a 28 gg, con mortalità che ha toccato anche il 15% in alcuni gruppi (Martin *et al.*, 2011). L'esatta modalità di trasmissione e i fattori di virulenza correlati a questo tipo di infezione non sono ancora noti quindi un'appropriate sorveglianza per mezzo di strumenti biomolecolari è necessaria per comprenderne meglio l'epidemiologia di questo microorganismo. Vari metodi biomolecolari sono stati utilizzati per tipizzare e caratterizzare geneticamente gli enterococchi, tra questi: ERIC-PCR, RAPD-PCR, Rep-PCR e PFGE (pulsed field gel electrophoresis) che è considerata il "gold standard" per la tipizzazione di numerose specie batteriche (Wijetunge *et al.*, 2012). Negli ultimi 10 anni la spettrometria di massa è divenuta un importante strumento d'indagine nei laboratori di microbiologia sia per l'identificazione batterica che per la sub-tipizzazione, come dimostrano i recenti lavori pubblicati su MRSA, *C. difficile* e *Legionella* (Wolters *et al.*, 2011; Reil *et al.*, 2011). Nel presente studio la PFGE e la spettrometria di massa sono state utilizzate per valutare le correlazioni epidemiologiche di ceppi di *E. cecorum* coinvolti in episodi di spondilite del pollo da carne.

### MATERIALI E METODI

#### Ceppi batterici

I ceppi batterici sono stati isolati tra il 2010 ed il 2014 e identificati mediante sistema miniaturizzato API RAPID ID 32 Strep (BioMérieux) o MALDI Biotyper (Bruker Daltonics) e conservati in criovials a -80 °C. In totale sono stati inclusi nello studio 34 ceppi di *E. cecorum* di cui 27 isolati da 16 gruppi di boiler commerciali. Tra questi gruppi, 9 presentavano le classiche lesioni all'apparato

scheletrico riferibili a spondilite ed erano tutti ibridi Ross (6 gruppi Ross-708 e 3 gruppi Ross-308) mentre gli altri ceppi erano stati isolati da sierose o organi parenchimatosi (fegato, milza, pericardio, sacco aereo). Nello studio sono stati inclusi anche 4 ceppi di *E. cecorum* isolati da ovaia, 1 da anatra e 2 da bovino.

#### Pulsed field gel electrophoresis

Il DNA genomico è stato estratto come descritto da Luey *et al.*, (2007) con alcune modifiche. Una singola colonia di ciascun ceppo di *E. cecorum* è stata risospesa in 5 ml di Brain Heart Infusion Broth (BHI) ed incubata in bagnetto termostato a 37 °C per 24 h, in leggera agitazione. La coltura batterica è stata successivamente portata alla densità di 5-10 McFarland e 500  $\mu$ l di tale sospensione sono stati centrifugati. Il pellet è stato risospeso in 500  $\mu$ l di TE Buffer (10mM tris-HCl, 1mM di EDTA, pH 8,0), addizionato di 1,6  $\mu$ g/ml di lisostafina e di 1 mg/ml di lisozima. Dopo incubazione a 37°C per 10 minuti alla sospensione batterica è stata aggiunta la Proteinasi K alla concentrazione finale di 330  $\mu$ g/ml e 500  $\mu$ l di SeaKem Gold Agarose (Biospa) all'1,2% ed è stata colata negli appositi plug-molds. Le plugs sono quindi state sottoposte a lisi per 1 ora a 55 °C in ES buffer (0,5 M EDTA pH 8,0, 1% sarkosyl) contenente 0,5 mg/ml di proteinasi K. Dopo due lavaggi con acqua per biologia molecolare e 4 lavaggi con TE buffer le plugs sono state sottoposte a restrizione enzimatica con 60 U/campione di *smal*. I frammenti di DNA sono stati separati attraverso elettroforesi in SeaKem Gold Agarose (Biospa) all'1% utilizzando lo strumento CHEF Mapper (Biorad). In ciascuna corsa è stato utilizzato come controllo dell'elettroforesi un ceppo di *Salmonella braenderup* H9812 ristretta con l'enzima XbaI.

I parametri di corsa sono stati i seguenti: switch time da 2 a 5 sec a 6V/cm per 6,5 ore alla temperatura controllata di 14 °C seguito da 13,5 ore di corsa con uno switch time da 20 a 40 secondi sempre a 14 °C. I fingerprint patterns sono stati analizzati utilizzando il software Bionumerics 7.1 (Applied Maths), la similarità è stata calcolata usando il Dice coefficient e come algoritmo di clustering è stato utilizzato l'UPGMA. Per l'elaborazione delle immagini l'ottimizzazione e la tolleranza sono stati impostati all'1%.

#### MALDI-TOF

I ceppi sono stati coltivati in Columbia agar (Oxoid) a 37 °C in condizioni di microaerofilia per 24 ore. I campioni sono stati quindi risospesi in 500  $\mu$ l di acqua ultrapura e le proteine sono state estratte mediante l'utilizzo di acido formico al 70% e aceto nitrile. L'estratto proteico è stato quindi analizzato in 6 repliche utilizzando lo strumento Microflex LT (Bruker Daltonics). Gli spettri sono stati acquisiti automaticamente in linear positive mode in un range da 2000 a 20000 m/z. Per la ionizzazione delle proteine batteriche è stata utilizzata come matrice una soluzione satura di HCCA ( $\alpha$ -Ciano-4-idrossycinnamic acid) in 50% di aceto nitrile e 2,5% di acido trifluoroacetico come da indicazioni del produttore. Gli spettri così ottenuti sono stati quindi importati nel software Bionumerics 7.1 (Applied Maths). La similarità degli spettri è stata calcolata usando il curve-based Pearson correlation coefficient e come algoritmo di clustering l'UPGMA sono state prese in considerazione solo le repliche con più del 95% di similarità.

## RISULTATI

### *Pulsed field gel electrophoresis*

Nell'albero filogenetico ottenuto è stato possibile individuare 6 cluster (similarità > 80%). In un cluster si sono disposti i ceppi di origine bovina che hanno presentato la maggiore lontananza genetica dai ceppi di origine aviaria. Tre ceppi isolati da ovaiole si sono collocati in un secondo cluster mentre il 4° ceppo da ovaiole ha presentato una similarità < 80% con tutti i ceppi inclusi nell'indagine. La maggiore vicinanza genetica (> 90%) è stata osservata tra i ceppi isolati da soggetti di uno stesso gruppo, o da distretti diversi di uno stesso soggetto. In 6 di questi casi i ceppi hanno mostrato clonalità (similarità > 95%).

### *MALDI TOF*

Per ciascun ceppo le varie repliche hanno dato origine a spettri sostanzialmente simili tra loro, con l'esclusione mediamente di 1 solo profilo outlier per ceppo. In totale l'elaborazione è stata eseguita su 150 profili spettrometrici.

Tutti i ceppi isolati da casi di spondilite hanno mostrato tra loro un'elevata similarità collocandosi in un unico cluster (similarità > 82%). I ceppi isolati da altre specie animali (bovini, anatre) o categorie produttive (ovaiole) hanno mostrato una similarità < 82% con quelli implicati in episodi di spondilite del broiler.

## DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

In molteplici studi la PFGE è stata utilizzata per caratterizzare ceppi di *E. cecorum* responsabili della spondilite del broiler. Tuttavia le conclusioni di tali studi risultano contrastanti in merito alla possibile clonalità dei ceppi isolati da lesioni ossee di animali di uno stesso gruppo (Kense and Landman, 2011; Wijetunge *et al.* 2012; Borst *et al.* 2012; Boerlin *et al.* 2012). I risultati della PFGE emersi nel presente studio dimostrano una sostanziale clonalità tra i ceppi isolati da soggetti diversi di uno stesso gruppo e da distretti diversi di uno stesso soggetto, siano essi organi parenchimatosi, sierose o tessuti ossei. Dato che la sintomatologia compare pressoché simultaneamente in un numero considerevole di soggetti che raggiungono lo stesso peso, è lecito ritenere che la diffusione non avvenga con le modalità di trasmissione che caratterizzano una comune malattia infettiva non epidemica, la quale si diffonde lentamente e inesorabilmente nel gruppo. A supportare questa ipotesi vi è l'evidenza che il tipo di lesione che caratterizza la spondilite del broiler è da considerarsi "cronica" in quanto prevede una riorganizzazione dei tessuti in preda ad osteonecrosi e la costituzione di una spessa capsula fibrosa esterna. Il fatto che lo stesso clone di *E. cecorum* sia stato inglobato contemporaneamente in distretti ossei diversi dello stesso animale, consente di sospettare che l'infezione sia il frutto di una localizzazione precoce, forse risalente addirittura alla fase di pulcino. Si sa che il sistema immunitario dell'ospite è scarsamente efficace nei tessuti ossei, così come la diffusione degli antibatterici in questi distretti. Questo potrebbe aver causato la persistenza e l'attività osteolitica degli enterococchi, con la formazione di tessuto anomalo non in grado di sostenere gli elevati pesi raggiunti in tempi sempre più rapidi dalle genetiche moderne.

La spettrometria di massa applicata all'identificazione batterica (MALDI Biotyper) si basa sulla rilevazione di fingerprint proteici, collegati alla definizione di "specie", come quelli ribosomiali. Al contrario, i metodi di sub-tipizzazioni batterica classi-

ci (es. sierotipizzazione) si basano sulla caratterizzazione di antigeni di membrana che possono avere diversa natura (lipopolisaccaridi, proteine, glucidi ecc.). Questo potrebbe spiegare perché i risultati di discriminazione del MALDI TOF si siano dimostrati meno performanti rispetto a quelli della PFGE, sebbene abbiano consentito di collocare tutti i ceppi isolati da episodi di spondilite vertebrale in un cluster unico (similarità > 82%). Al contrario, i ceppi isolati da altre specie (bovino, anatra) o categorie produttive (ovaiole), risultano al di fuori di tale cluster, lasciando ipotizzare un adattamento di specie e categoria produttiva dei ceppi di *E. cecorum*.

## BIBLIOGRAFIA

Boerlin P, Nicholson V, Brash M, Slavic D, Boyen F, Sanei B, Butaye P. (2012). Diversity of *Enterococcus cecorum* from chickens. *Veterinary Microbiology* 157: 405–411.

Borst LB, Suyemoto MM, Robbins KM, Lyman RL, Martin MP, Barnes HJ. (2012). Molecular epidemiology of *Enterococcus cecorum* isolates recovered from enterococcal spondylitis outbreaks in the southeastern United States. *Avian Pathol.* 41(5): 479-485.

Kense MJ, Landman WJM. (2011). *Enterococcus cecorum* infections in broiler breeders and their offspring: molecular epidemiology. *Avian Pathol.* 40(6), 603-612.

Martin LT., Martin PM., Barnes HJ. (2011). Experimental reproduction of Enterococcal Spondylitis in Male Broiler Breeder Chickens. *Avian Disease* 55: 273–278.

Luey CK, Chu YW, Cheung TK, Law CC, Chu MY, Cheung DT, Kam KM. (2007). Rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for subtyping of *Streptococcus suis* serotype 2. *J Microbiol Methods*, 68(3):648-50.

Reil M, Erhard M, Kuijper EJ, Kist M, Zaiss H, Witte W, Gruber H, Borgmann S. (2011). Recognition of *Clostridium difficile* PCR-ribotypes 001, 027 and 126/078 using an extended MALDI-TOF MS system. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.*, 30(11):1431-6.

Wijetunge DS, Dunn P, Wallner-Pendleton E, Lintner V, Lu H, Kariyawasam S. (2012). Fingerprinting of poultry isolates of *Enterococcus cecorum* using three molecular typing methods. *J Vet. Diagn. Invest.*, 24(6):1166-71.

Wolters M1, Rohde H, Maier T, Belmar-Campos C, Franke G, Scherpe S, Aepfelbacher M, Christner M. MALDI-TOF MS fingerprinting allows for discrimination of major methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* lineages. *Int J Med Microbiol.* 2011, 301(1):64-8.