

**Sviluppo di un vaccino ricombinante per la mastite
ovina da *Staphylococcus aureus* a partire dai geni
codificanti per i principali antigeni
immunodominanti**

Sebastiana Tola

sebastiana.tola@izs-sardegna.it



ISTITUTO ZOOPROFILATTICO
SPERIMENTALE DELLA SARDEGNA
"G. PEGREFFI"

Roma 13 dicembre 2022

Patrimonio zootecnico della Sardegna

- Pecore di razza *sarda**

3.019.108

- Capre*

281.569

- Bovini da latte*

48.944

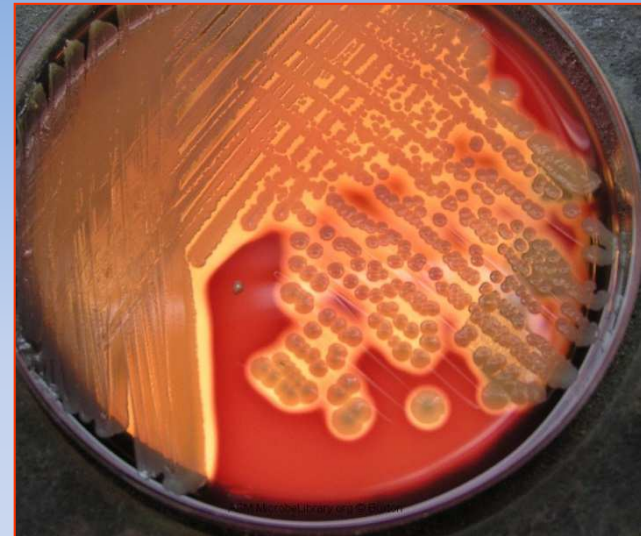
In Sardegna viene raccolto il **68,92%** del latte ovino ed il **57,30%** del latte caprino prodotto in Italia.

*Sardegna Agricoltura, 2019.

<https://www.sardegnaagricoltura.it/index.php?xsl=443&s=413001&v=2&c=6039&vd=1>



Staphylococcus aureus



Negli ovini e nei caprini, è responsabile prevalentemente di infezioni mammarie (IM). La mastite può svilupparsi in una forma acuta (mastite gangrenosa), che spesso porta a morte l'animale colpito.

Vaccini stabulogeni e autovaccini

- Ministero della Sanità

Decreto 17 marzo 1994 , n. 287

Regolamento recante norme sulla produzione, l'impiego ed il controllo dei medicinali veterinari immunologici inattivati, aventi caratteristiche di vaccini stabulogeni ed autovaccini.



Il vaccino è composto dal **pellet di una coltura di *S. aureus* risospeso in fisiologica, inattivato con formalina e adiuvato con idrossido di alluminio**

Vaccino Stabulogeno

Il **vaccino stabulogeno** è un medicinale ad azione immunizzante preparato con microrganismi patogeni e/o antigeni isolati da animali colpiti dalla forma infettiva dominante in quel determinato allevamento.

Sono impiegati per vaccinare gli animali di tale allevamento e/o animali di allevamenti dello stesso territorio, qualora ritenuto opportuno per documentati motivi epidemiologici

Nota del Ministero della Salute del 2015

DGSAF 0015165-P-08/06/2015

- Priorità ai presidi immunizzanti regolarmente autorizzati con procedure nazionali o comunitarie e disponibili per le varie esigenze del territorio.
- La produzione di stabulogeni, in presenza di vaccini commerciali, può essere giustificata dall'unicità degli isolati ottenuta mediante la loro tipizzazione

Vaccini commerciali disponibili per i piccoli ruminanti

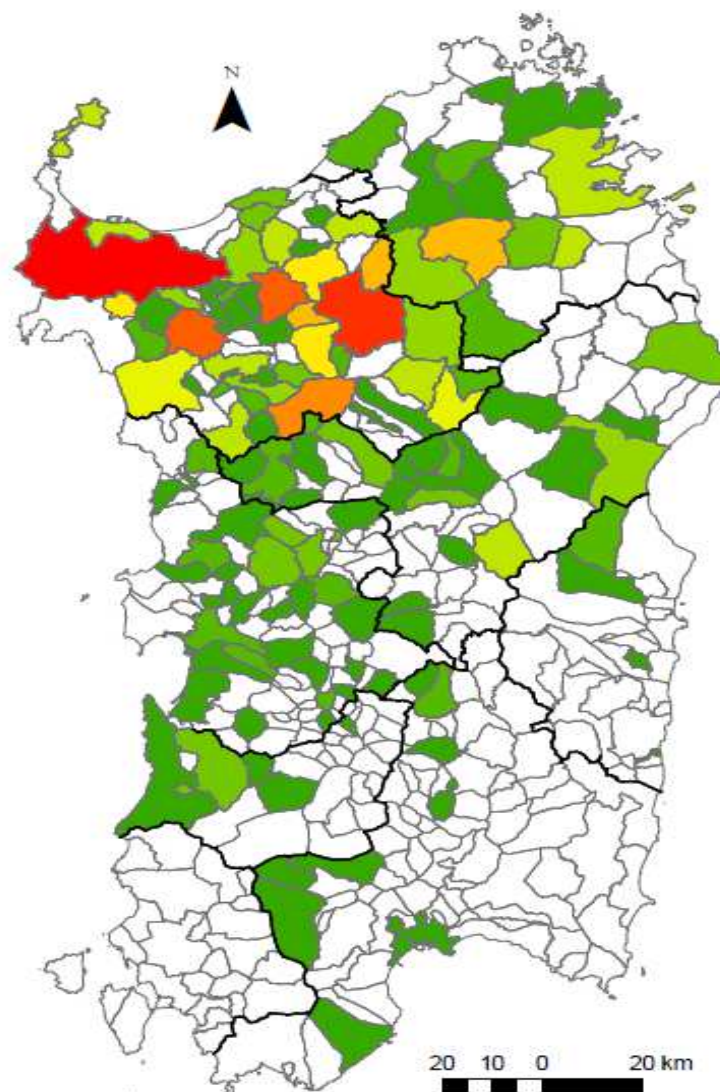
- **Vimco[®]** (Hipra, Spagna), costituito da coltura inattivata di *S. aureus* produttore di biofilm
- **Ovax M.G.S.** (Fatro, Italia), costituito da coltura di *S. aureus* inattivata e adiuvata con idrossido di alluminio contenente α e β emolisine

Anno	Isolati
1986	9
1987	9
1988	13
1989	4
1990	15
1991	35
1992	7
1993	8
1994	18
1995	13
1997	7
1998	27
1999	51
2000	43
2004	1
2005	3

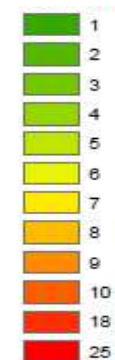
Tipizzazione degli isolati di *S. aureus* che circolano in Sardegna

330 isolati
25 anni

Anno	Isolati
2007	4
2008	3
2009	6
2010	5
2011	5
2012	13
2013	6
2014	12
2015	13



N° di
isolati/Comune



Osservatorio Epidemiologico Veterinario Regionale

(Deliberazione Giunta Regionale n. 33/9 del 12 settembre 2008)

CdSE Centro di Sorveglianza Epidemiologica



Antimicrobico resistenza (AMR)

Diffusione in piastre di Mueller-Hinton agar

(Clinical and Laboratory Standards Institute , 2011)

- 1- penicillina (PEN, 10 U.I.)
- 2- **streptomicina** (S, 10 µg)
- 3- novobiocina (NV, 30 µg)
- 4- **oxacillina** (OXA, 1 µg)
- 5- kanamicina (KAN, 30 µg)
- 6- **gentamicina** (GEN, 10 µg)
- 7- eritromicina (ERY, 15 µg)
- 8- **trimethoprim-sulfametoxazolo** (SXT, 25 µg)
- 9- cefalotina (CEF, 30 µg)
- 10- **ampicillina** (AMP, 10 µg)
- 11- amoxicillina-acido clavulanico (AMC, 30 µg)
- 12- **tetraciclina** (TET, 30 µg)



Antimicrobico resistenza (AMR)

S. aureus (ATCC 25923, quality control)

Breakpoint ,mm (CLSI):

- “sensibili”, “**intermedi**” o “resistenti”
- **Oxacillina**: breakpoint < 17mm = 0,5 µg/ml MIC breakpoint
- PCR gene **mecA** (primers mA1-mA2, Kondo *et al.*, 2007)



Risultati: **Antimicrobico resistenza**



Sensibili:
90.3%

Resistance to	Year (n° of isolates)
CN	1986 (1)
S (n=4)	1998 (1), 2000 (1), 2011 (2)
AMP/PEN (n=8)	1991 (1), 1998 (1), 2000 (1), 2009 (1), 2014 (1), 2015 (3)
TET (n=13)	1987 (1), 1994(1), 1995 (2), 1998 (1), 1999 (2), 2000 (1), 2006 (1), 2011 (1), 2012 (1), 2015 (2)
AMP/PEN-TET	2015 (1)
S-TET	1990 (1)
AMP/PEN-AMC	2007 (1), 2013 (1)
AMP/PEN-S-TET	1999 (1)
AMP/PEN-KF-ERY-KAN-S-AMC- OXA	2012 (1)

9.7%

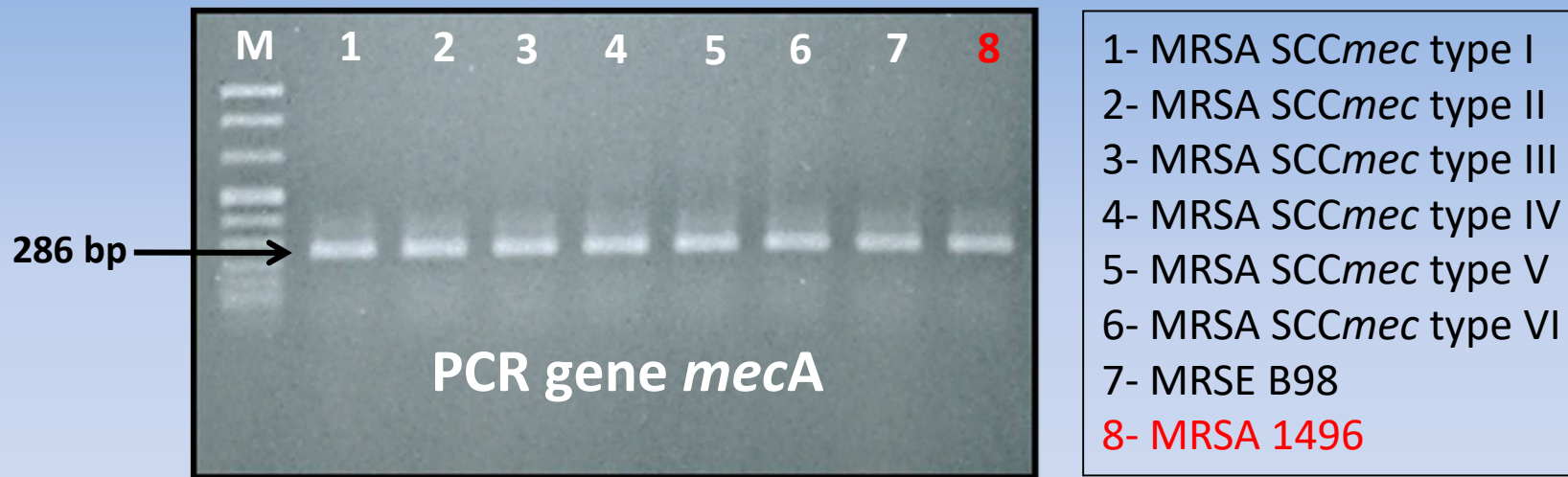
^a Antibiotic abbreviations: CN (gentamicin), S (streptomycin), AMP (ampicillin), PEN (penicillin), TET (tetracycline), AMC (amoxicillin/clavulanic acid), KF (cephalothin), ERY (erythromycin), KAN (kanamycin), OXA (oxacillin).



Campione 1496 proveniente da Orotelli/Nuoro

Risultati del campione 1496 MRSA

SCCmec typing



SCCmec types I, II, III, IV, V, VI gentilmente forniti dalla prof. ssa Herminia de Lencastre, Laboratory of Microbiology and infectious Diseases, The Rockefeller University, N.Y.

Resistenza in *Staphylococcus aureus*

Geni coinvolti

- ❖ *mecA* (penicillin-binding protein, PBP2a o PBP2')
- ❖ Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* element (SCC*mec*)
- ❖ *ccr* (cassette chromosome recombinase) *gene complex*/*mec* gene complex

TABLE 1. SCC*mec* types identified in *S. aureus*

SCC <i>mec</i> type	<i>ccr</i> gene complex ^a	<i>mec</i> gene complex
I	1 (A1B1)	B
II	2 (A2B2)	A
III	3 (A3B3)	A
IV	2 (A2B2)	B
V	5 (C)	C2
VI	4 (A4B4)	B
VII	5 (C)	C1
VIII	4 (A4B4) ^b	A

^a *ccr* genes in the gene complex are indicated in parentheses.

^b *ccrA4B4* genes found in type VIII SCC*mec* were nearly identical to those in the *S. epidermidis* SCC-CI element and showed nucleotide identities of 89.6% and 94.5% to those found in type VI SCC*mec*.

Vol. 53, 2009

COMMENTARY 4

Type I(1B)
(NCTC10442)

Type II(2A)
(N315)

Type III(3A)
(85/2082)

Type IV(2B)
(CA05)

Type IV(2B&5)
(ZH47)

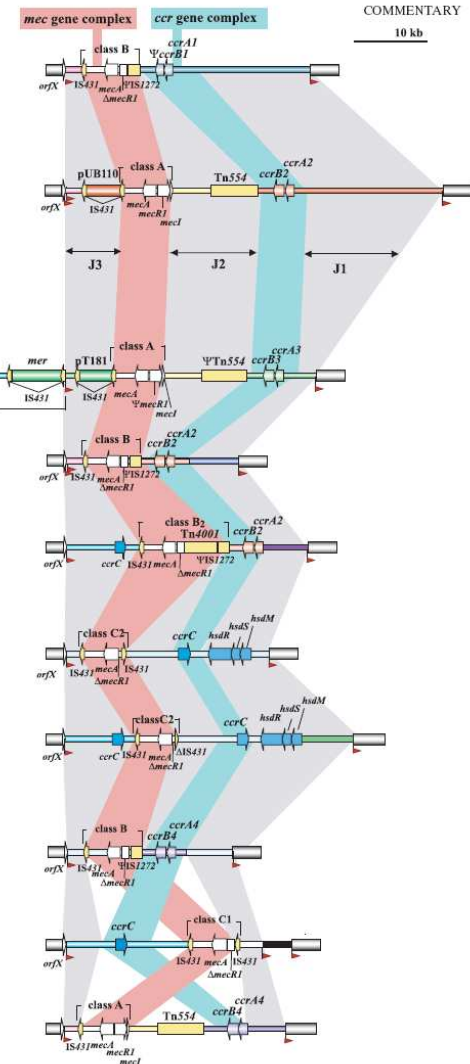
Type V(5C2)
(WIS)

Type V(5C2&5)
(TSGH17, PM1)

Type VI(4B)
(HDE288)

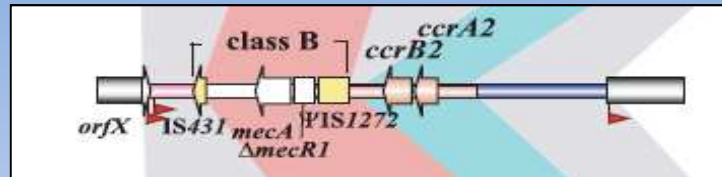
Type VII(5C1)
(JCSC6082)

Type VIII(4A)
(C10682)



SCCmec type IV

MRSA 1496



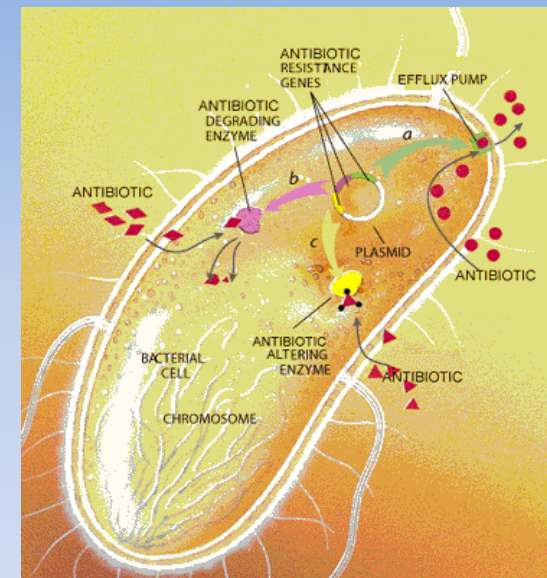
In base alle linee guida dell'

International Working Group on the Classification of
Staphylococcal Cassette Chromosome Elements (IWG-
SSC, 2009)

Typing del gene **tet**

tetK e tetL- attivano pompe da efflusso che riducono la concentrazione intracellulare dell'antibiotico, proteggendo in questo modo i ribosomi ([efflux proteins](#))

tetM e tetO- attivano proteine che riducono la sensibilità dei ribosomi all'azione delle tetracicline ([ribosomal protection proteins](#))



Typing del gene *tet* (n=16)

R
I
S
U
L
T
A
T
I

GENE	ISOLATE	%
<i>tetK</i>	n=15*	94

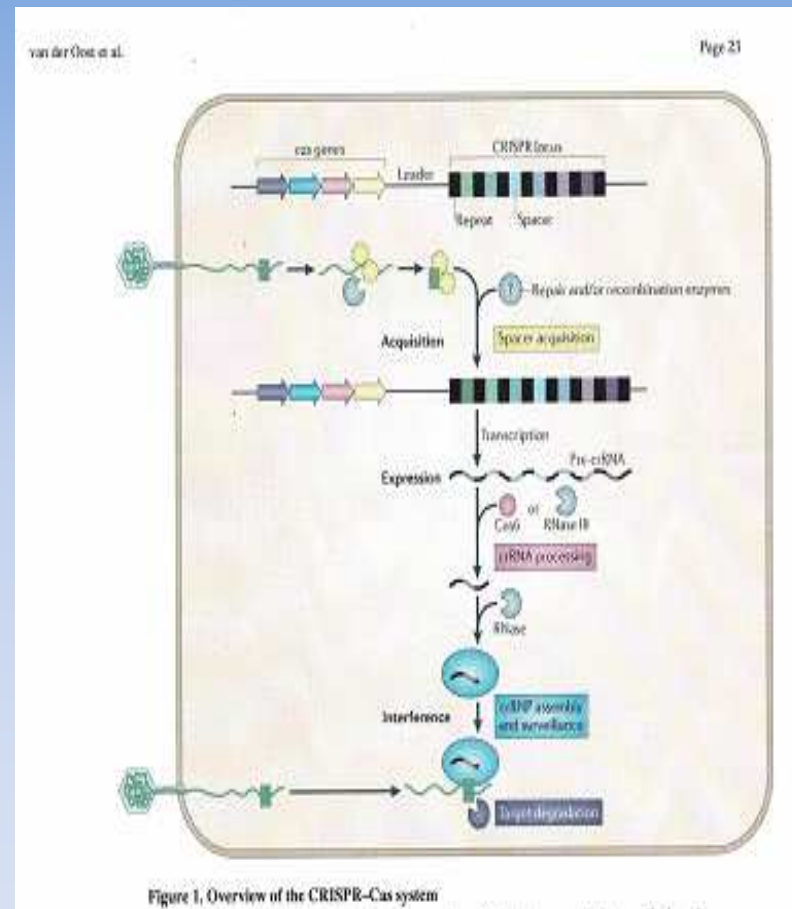
* Uno di questi, MDR 4438 del 1999 (resistente a AMP/PEN-S-TET) presentava anche il gene *tetO*

GENE	ISOLATE
<i>tetM</i>	2412 del 2012
<i>tetL</i>	---

Il gene *tetK* è localizzato in plasmide (non è il pT181, Guay et al., 1993)

Stafilococchi e altri batteri

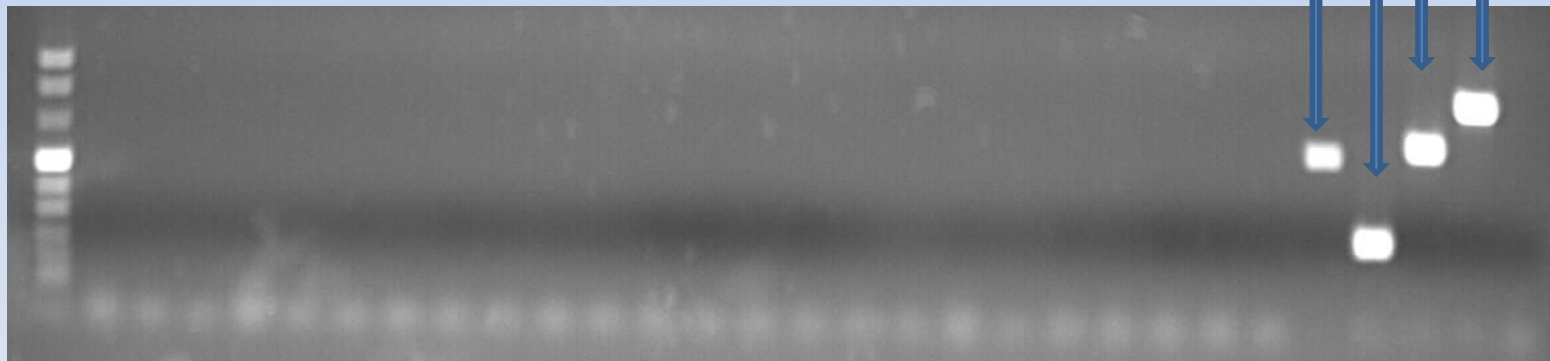
I batteri hanno sviluppato dei sofisticati sistemi immunitari adattivi, conosciuti come **CRISPR-Cas** (clustered regularly interspaced short palindromic repeats-CRISPR-associated proteins) che riconoscono e inattivano virus e plasmidi esogeni (Van der Oost *et al.*, 2014)



S. aureus ovis

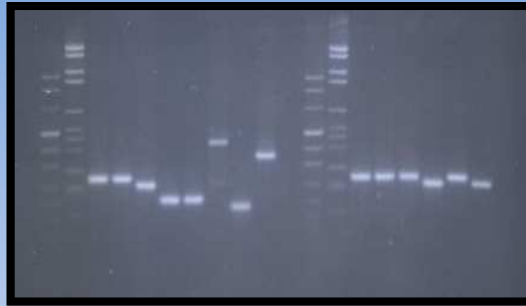
Analisi del **Type III-A** con **Cas 1** (577 bp), **Cas 2** (255 bp), **Cas 6** (630 bp) e **Cas 10** (883 bp) (Cao L., et al., 2016)

Negli *S. aureus* ovis manca il sistema CRISPR-Cas



RS-ATCC 35984

Epidemiologia molecolare: *spa* typing



```
A G A G G A A G A C A A T A A C A A G C C T G G T A A A G A A G A C A G C A A C A A A C C  
T G C T A A A C G A T G C T C A A G C A C C A A A G C A A A G A A G A C G G C A A C A A G C  
C T G G T A A A G A A G A T G G C A A C A A A C C T G G T A A A G A A G A C G G C A A C A  
A G C C T G G T A A A G A A G A C G G C A A C G G A G T A C A T G T C G T T A A A C C T G G  
T G A T A C A G T A A A T G A C A T T G C A A A A G C A A A C G G C A C T A C T G C T G A A
```

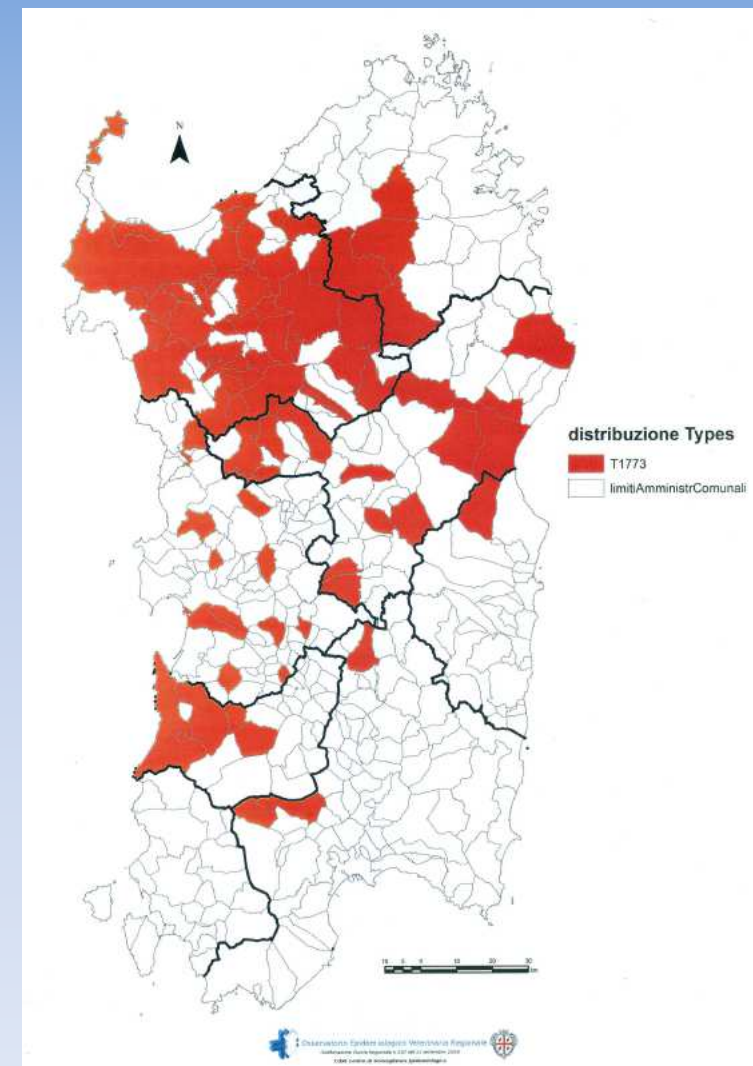


Programma on-line

<http://spaserver.ridom.de/>

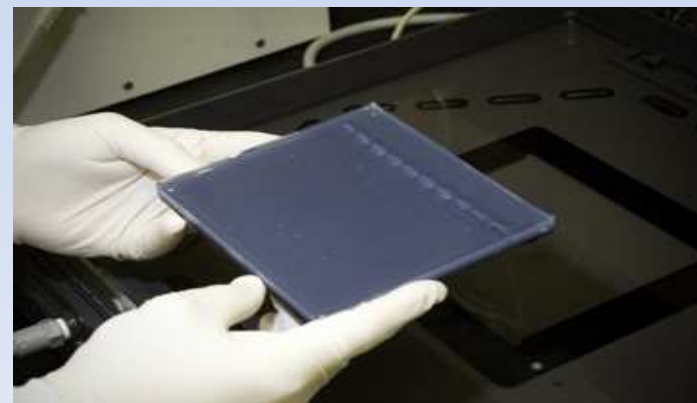
Spa typing: risultati

<i>spa</i> type	Year (n° of isolates)
t1773 (n=186)	1986 (8); 1987 (5); 1988 (7); 1989 (3); 1990 (10); 1991 (20); 1992 (5); 1993 (7); 1994 (11); 1995 (10); 1997 (4); 1998 (16); 1999 (29); 2000 (20); 2004 (1); 2005 (2); 2007 (2); 2008 (2); 2009 (2); 2010 (3); 2011 (2); 2012 (5); 2013 (3); 2014 (3); 2015 (6)
t2678 (n=53)	1988 (3); 1989 (1); 1991 (4); 1992 (2); 1993 (1); 1994 (6); 1998 (4); 1999 (10); 2000 (6); 2005 (1); 2009 (1); 2010 (1); 2011 (2); 2012 (4); 2014 (5); 2015 (2)
t7754 (n=14)	1986 (1); 1991 (4); 1995 (1); 1997 (1); 1999 (1); 2000 (4); 2007 (1); 2008 (1)
t1403 (n=9)	1990 (3); 1991 (1); 1999 (3); 2000 (1); 2005 (1)
t524 (n=5)	1987 (1); 1991 (3); 2000 (1);
t1532 (n=5)	1997 (1); 1999 (1); 2000 (3)
t6060 (n=4)	1995 (1); 1997 (1); 1999 (1); 2014 (1)
t8662	1990 (1); 1991 (1); 1999 (1)
t5428	1988 (1); 1998 (1)
t 3577	1991 (1)
t 3495	1998 (1)
t 10765	1998 (1)
t 209	1999 (1)
t 3571	1999 (1)
t 1541	2000 (1)
t 3045	2000 (1)
t 7302	2000 (1)
t 7538	2000 (1)
t 7579	2000 (1)
t 998	2000 (1)
t 13078	2007 (1)
t 232	2009 (1)
t 12041	2011 (1)
t 3896 (MRSA)	2012 (1)
t 6056	2012 (1)
t 6058	2012 (1)
t 5242	2014 (1)
t 742	2014 (1)
t 9268	2014 (1)



Genotyping mediante PFGE

La genotipizzazione è uno strumento importante negli studi epidemiologici in quanto contribuisce alla comprensione della disseminazione dei patogeni e fornisce un mezzo per correlare i ceppi. La tipizzazione con elettroforesi su gel a campo pulsato (PFGE) è il metodo più utilizzato per affrontare problemi epidemiologici a breve termine, mentre la tipizzazione a sequenza multipla (MLST) fornisce le informazioni più affidabili sul clustering filogenetico e sull'epidemiologia globale a lungo termine.



Epidemiologia molecolare: Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)

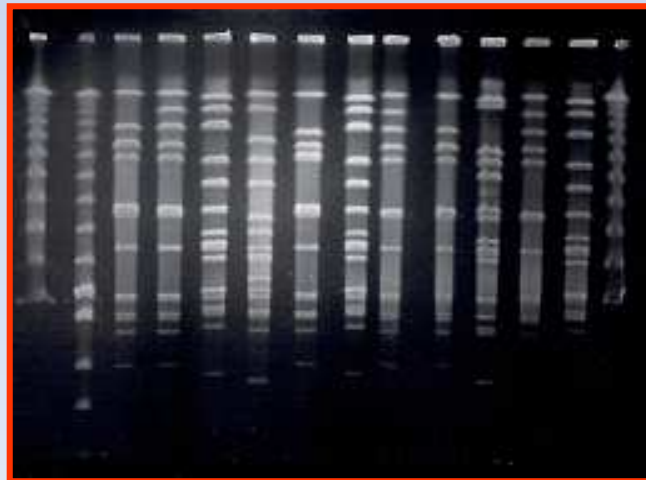
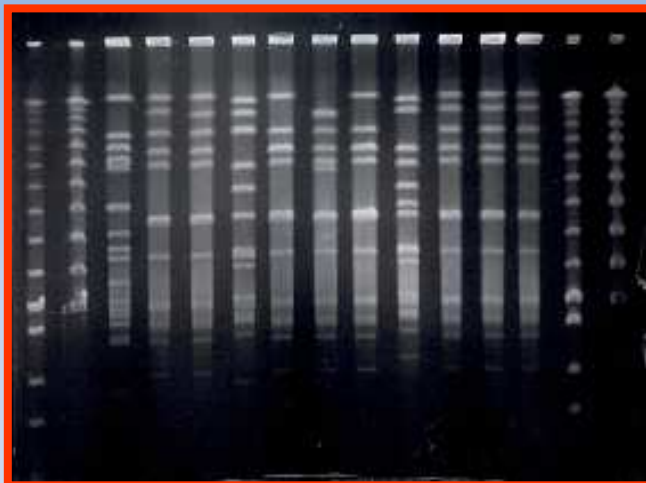


Table 6-Association between each predominant *spa* type with PFGE subtypes

<i>spa</i> type (n° of isolates)	PFGE pattern (n° of isolates)
t1773 (186)	A1(97), A2(34), A3(25), A4(2), A5(13), A6(1), A7(7), A8(3), A9(1) A10(1) A11(1) A12(1)
t7754 (14)	A1(9), A3(3), A7(1), A8(1)
t1532 (5)	A1(2), A3(2), A5(1)
t524 (5)	A13 (3), A14 (2)
t2678 (53)	B1(34), B2(13), B3(3), B4(1),
t6060 (4)	B5(1), B6(1)
t1403 (9)	B1(2), B4(1), B7(1)
	C (9)
t3896 (MRSA)	D(1)



Digestione del DNA
cromosomiale con
l'enzima ***Sma***

MLST (Multi Locus Sequence Typing)

arcC-aroE-glpF-gmk-pta-tpi-yqiL

Predicted Clonal Complex (%)	ST	<i>spa</i> repeat succession	<i>spa</i> type (n° of isolates)
CC130 (62.1%)	700	04-82-17-25-17	t1773 (186)
	700	04-82-17-25	t7754 (14)
	700	04-82-17	t1532 (5)
CC133 (17.2%)	133	03-16-12-21-17-23-23-17-17-17-23-24	t2678 (53)
	133	03-16-12-21-17-23-13-17-17-16-23-24	t6060 (4)
CC1	1	07-16-21-16-34-33-13	t3896 (1)



CC130

Italia- Azara *et al.*, 2017

Algeria- Azzi *et al.*, 2020

CC133

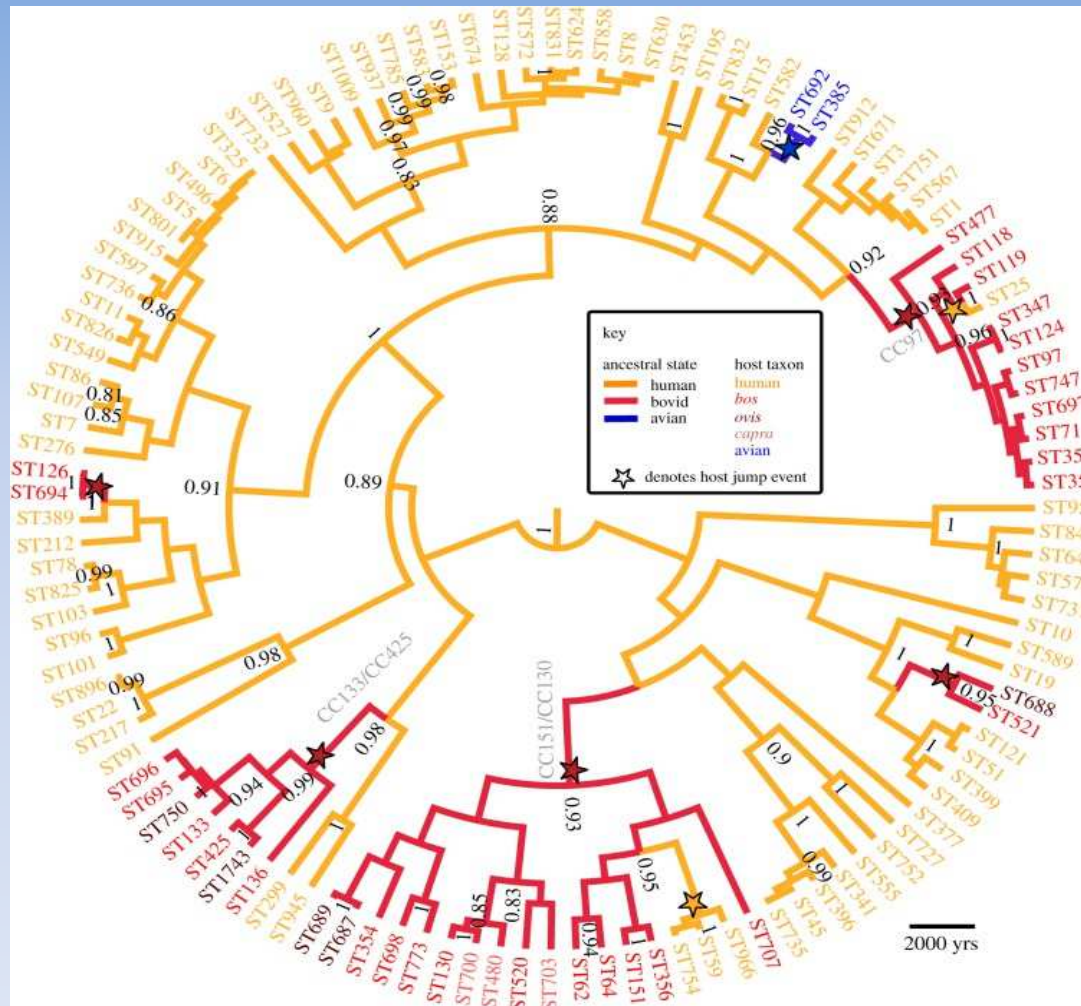
Spain- Porrero *et al.*, 2012

France- Ben Zakour *et al.*, 2008

Denmark- Eriksson *et al.*, 2013

Brazil- de Almeida *et al.*, 2011

Weinert LA et al., 2012. *Molecular dating of human-to-bovid host jumps by Staphylococcus aureus reveals an association with the spread of domestication.* Biol Lett. 2012 Oct 23;8(5):829-32. doi: 10.1098/rsbl.2012.0290.



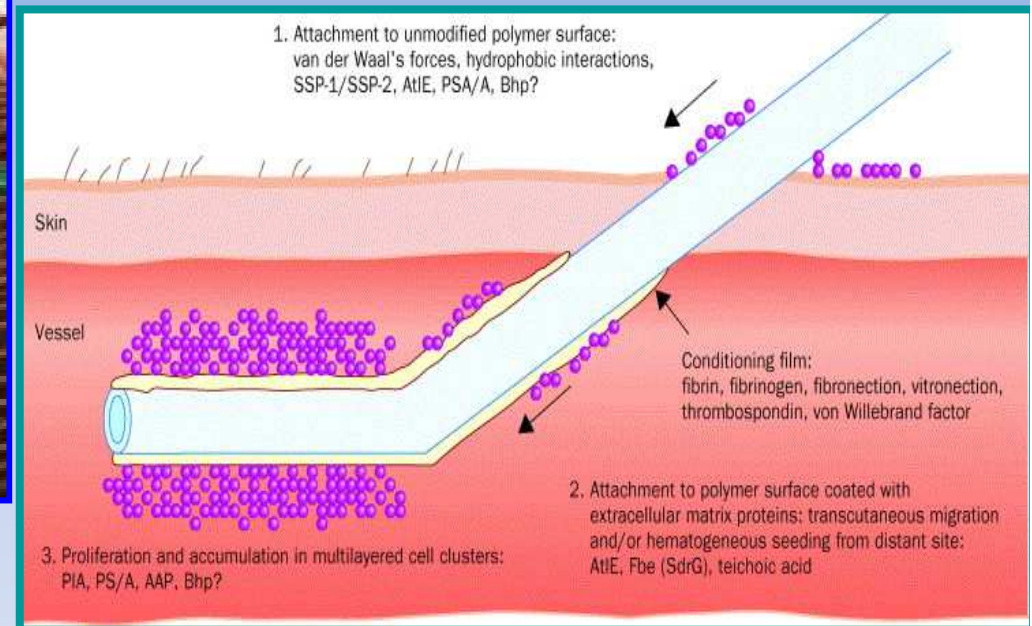
Switch CC130
dated **5429** years
ago (range 3082-
8981)

Switch **CC133**
dated **3313** years
ago (range 1183-
6113) during the
period of specialization
of secondary product,
such as wool.

Conclusioni

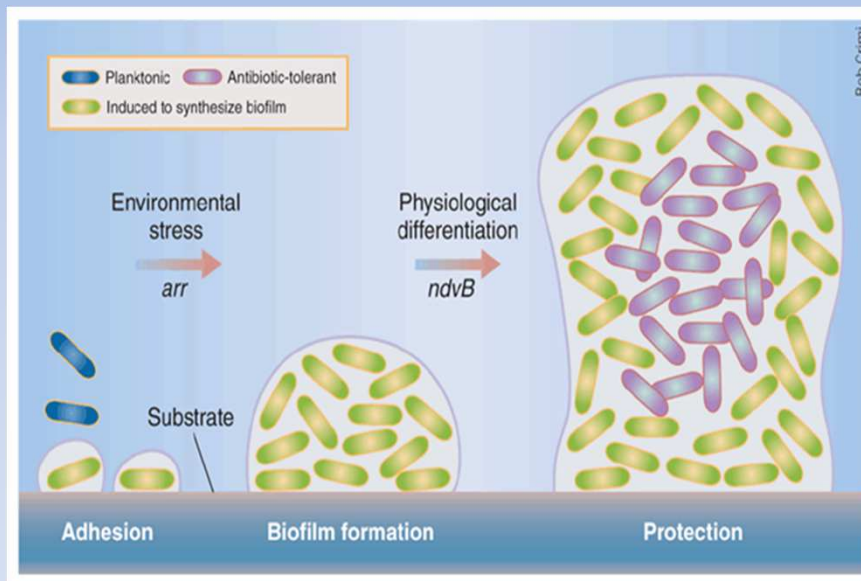
- In Sardegna, *S. aureus* associato a mastiti ovine è il lineage ancestrale **CC130/ST700/ t1773**
- Ipotizziamo che possa esserci una correlazione tra lineage ancestrale-sensibilità antimicrobica
- L'MRSA 1496 (SCCmec type IV) è stato classificato come t3896, ST1 e CC1, un complesso clonale isolato nell'uomo ma, di recente, riscontrato nei bovini e nei maiali (Luini *et al.*, 2015; Normanno *et al.*, 2015)

PRODUZIONE DI BIOFILM



**Biofilm è prevalentemente di natura polisaccaridica:
N-acetil β -1,6 glucosamina (PNAG)**

STEPS per la PRODUZIONE DI BIOFILM




- Attacco
 - Sviluppo in multistrato
 - Produzione di matrice esopolisaccaridica
 - Rilascio di cellule batteriche planctoniche
-
- Limita l'azione fagocitica delle cellule del sist. Immunitario
 - Limita l'azione degli antibiotici
 - Persistenza delle infezioni

PRODUZIONE DI BIOFILM:

**Semina di 258 isolati di *S. aureus* CC130 e CC133
in CRA (Congo Red Agar) (Arciola *et al.*, 2001)**

**Analisi dei 258 isolati in PCR dei geni
icaA-icaD (*InterCellular Adhesion*)
e *bap* (*Biofilm Adhesion protein*)**

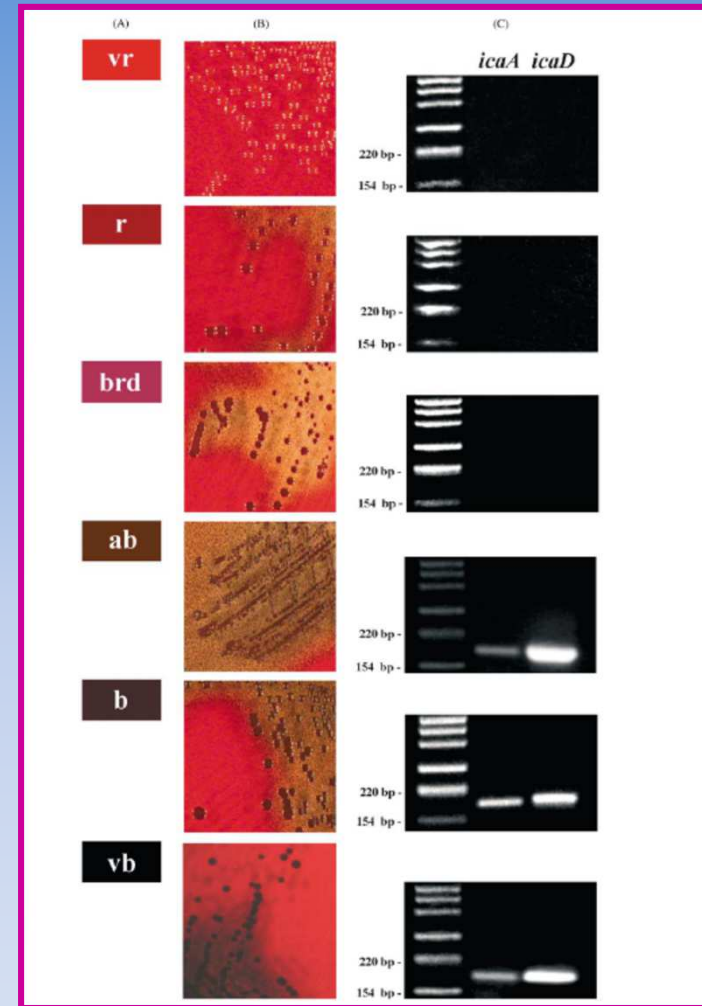
Controllo positivo
***S. aureus* RP62A**
Controllo negativo
***S. epidermidis* ATCC 12228**



Dr.ssa Manuela Oliveira del
laboratorio di Microbiologia e
Immunologia
della Facoltà di Medicina Veterinaria
di Lisbona



Piastra di CRA contenente i ceppi di referenza
S. epidermidis ATCC 12228 (controllo -, *red*) e
S. aureus RP62A (controllo +, *very black*)



Arciola et al., 2001; Cuccarella et al., 2004

PRODUZIONE BIOFILM: *S. aureus* ovini



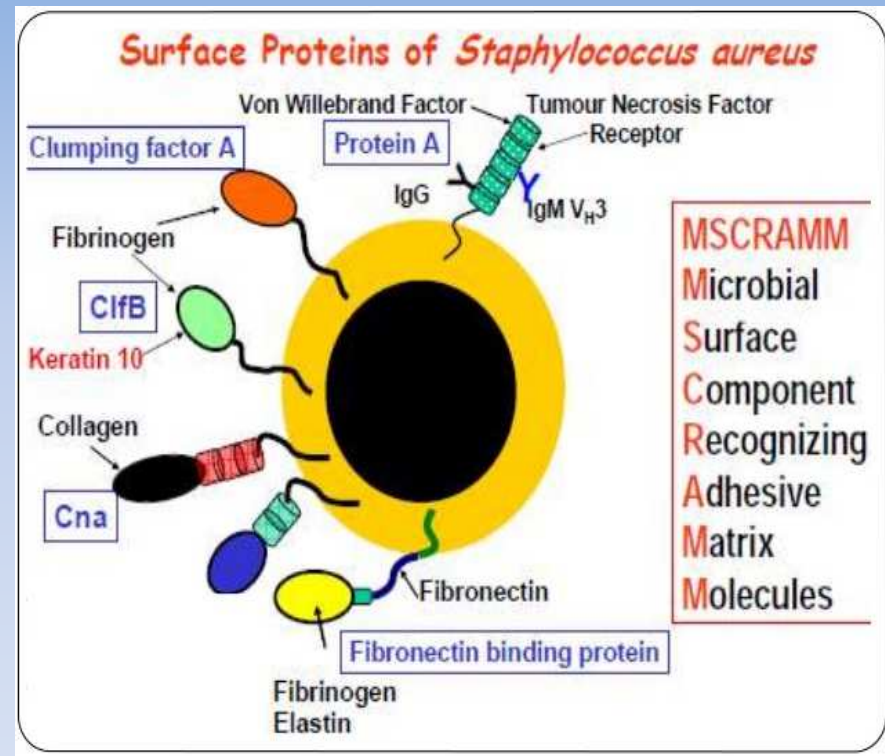
No
biofilm



PCRs
per *icaA*, *icaD* e *bap*
NEGATIVE

Patogenesi di *S. aureus*: 1 step

Adhesion to the mammary gland epithelium



Analisi MSCRAMMs nei 258 isolati

Table 2 Primers used for the detection of genes related to several microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules

Gene	Nucleotide sequence (5'-3')	Amplicon size (bp)	References
<i>clfA</i>	GGCTTCAGTGCTTGTAGG TTTTCAAGGTCAATATAAGC	1042	Stephan et al. (2001)
<i>clfB</i>	TGCAAGATCAAACCTGTTCTT TCGGTCTGTAAATAAAGGTA	596	Peacock et al. (2002)
<i>fnbA</i>	CACAAC CAG CAAATATAG CTGTGTGGTAATCAATGTC	1362	Peacock et al. (2002)
<i>fnbB</i>	GTAA CAGCTAATGGTC GAATTGATACT CAAGTTCGATAGGAGTACATGTTT	524	Vancraeynest et al. (2004)
<i>bbp</i>	CAGTAAATGTGTCAAAGA TACACCTCTGTTGAACCTG	1050	Peacock et al. (2002)
<i>cna</i>	GTCAAGCAGTTATTAA CACCAGAC AATCAGTAATTGCATTGTCCACTG	423	Tristan et al. (2003)
<i>eno</i>	ACGTGCAGCAIGCTGACT CAACAGCATYCTTCAGTACCTTC	302	Tristan et al. (2003)
<i>fib</i>	CTACAAC TACAATTGCCGTCAACAG GCTCTTGTAAGACCATTTCCTCAC	404	Tristan et al. (2003)
<i>ebpS</i>	AGAATGCTTTTGCAATGGAT AATATCGCTAATGCACCGAT	652	Vancraeynest et al. (2004)
<i>sdrC</i>	ACGACTATTA AACCAAGAAC GTA CTTGAAAT AAGCGGTTG	560	Peacock et al. (2002)
<i>sdrD</i>	GG AATAAGTTGAAGTTTC ACTTTGT CATCAACTGTAAT	500	Peacock et al. (2002)
<i>sdrE</i>	CAGTAAATGTGT CAAAAGA TTGACTACCAGCTATATC	767	Peacock et al. (2002)

clfA and *B* (genes encoding clumping factors A and B)
fnbA and *B* (genes encoding fibronectin-binding protein A and B)
bbp (gene encoding bone sialoprotein-binding protein)
cna (gene encoding collagen-binding protein); *eno* (gene encoding laminin-binding protein)
fib (gene encoding fibrinogen-binding protein); *ebpS* (gene encoding elastin-binding protein)
sdr locus (gene encoding serine-aspartate repeat proteins)

Patogenesi di *S. aureus*: 2 step

- Activation of virulence determinants
 - ❖ Pyrogenic toxins SEs and TSST-1 (toxin shock syndrome toxin-1)
 - ❖ Leukotoxins
 - ❖ Haemolysins
 - ❖ AtIA

Staphylococcus aureus

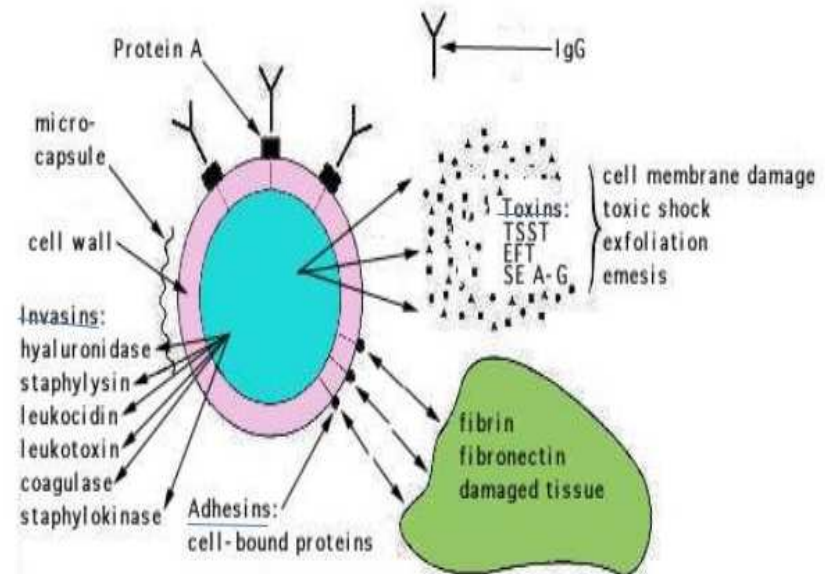


Fig . Virulence determinants of *Staphylococcus aureus*

Geni di virulenza

Table 1 Primers used for the detection of genes related to biofilm formation (*icaA* and *icaD*), pyrogenic toxins (*sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see* and *tsst-1*), leukotoxins (*lukD-E*, *lukM* and *lukPV83*), haemolysins (*hly-β* and *hly-γ*) and autolysin (*atlA*) genes

Gene	Nucleotide sequence (5'-3')	Amplicon size (bp)	References
<i>icaA</i>	CACGTGCTCTATGCTGGATG CCGTTGGATATTGCCCTCTGT	502	Vandecasteele et al. (2003)
<i>icaD</i>	ATGGTCAAGCCAGACAGAG CGTGTTTCAACATTAAATGCAA	198	Arcoletti et al. (2002)
<i>sea</i>	GCAGGGAAACAGTTTAGGC GTTCTGTAGAAGTATGAAACACG	520	Monday and Bolhach (1999)
<i>seb</i>	ACATGTAATTTTGATATTCGCACTG TGCAGGCATCATGTCATACCA	667	Monday and Bolhach (1999)
<i>sec</i>	CTTGATGTATGGAGGAATAACAA TGCAGGCATCATATCATACCA	283	Monday and Bolhach (1999)
<i>sed</i>	CTAGTTTGTGAATATCTCCT TAATGCTATATCTTATAGGG	317	Johnson et al. (1991)
<i>see</i>	TACCAATTAACCTTGTGGATAGAC CTCTTGCACCTTACCGC	170	Monday and Bolhach (1999)
<i>tsst-1</i>	GCCTTGCAGCAACTGCTACAG TGGATCCGTCATTCTTGTAT	559	Lovseth et al. (2004)
<i>lukD-E</i>	LukD/E1: TTAGGATATAACATTGGAGGTA LukD/E2: GATTAGTTTCTTTAGAAATCCGT	1499	This study*
<i>lukM</i>	LukM1: CTACTACTAATGCAGAAATAT LukM2: ATTAGGTCCTCTTGTCGTATT	563	This study†
<i>lukPV83</i>	LukPV-F: TGGATGACAAAATCACCTTGT LukPV-R: CCCAATCAATTTCATAAATTGA	792	This study‡
<i>hly-β</i>	Hly-β-F: GTTGGTGCACTTACTGACAA Hly-β-R: GCATATACATCCATGGCTT	838	This study§
<i>hly-γ</i>	Hly-γ-F: GCTGCCAATGATACTGAAGA Hly-γ-R: TGAGTCTTCAATTGACTTCA	837	This study¶
<i>atlA</i>	AtlA-F: AATGTTTGCAATTAACGCTTGT AtlA-R: TTATCGTCGAACGATCATTAG	791	This study**

Initial denaturation: 95 °C × 5 min; final extension: 72 °C × 10 min.

*30 cycles 95 °C × 60 s, 56 °C × 60 s, 72 °C × 120 s.

†30 cycles 95 °C × 60 s, 56 °C × 60 s, 72 °C × 60 s.

‡30 cycles 95 °C × 60 s, 54 °C × 60 s, 72 °C × 90 s.

§30 cycles 95 °C × 60 s, 56 °C × 60 s, 72 °C × 90 s.

¶30 cycles 95 °C × 60 s, 56 °C × 60 s, 72 °C × 90 s.

**30 cycles 95 °C × 60 s, 56 °C × 60 s, 72 °C × 60 s.

Risultati

Table 5 Results of testing 258 *Staphylococcus aureus* isolates for various single adhesin genes and some gene combination (A), by PCR

MSCRAMMs Gene	N° of Isolates (%)
<i>clfA</i>	6 (2.3)
<i>clfB</i>	12 (4.6)
<i>clfA/clfB</i>	213 (82.5)
<i>fmbA</i>	188 (72.8)
<i>fmbB</i>	–
<i>fmbA/fmbB</i>	–
<i>bbp</i>	1 (0.4)
<i>cna</i>	44 (17.0)
<i>eno</i>	229 (88.7)
<i>fib</i>	238 (92.2)
<i>epbs</i>	208 (80.6)
<i>sdrC</i>	24 (9.3)
<i>sdrD</i>	–
<i>sdrE</i>	5 (1.9)
<i>sdrC/sdrD</i>	–
<i>sdrC/sdrE</i>	196 (75.9)
<i>sdrD/sdrE</i>	–
<i>sdrC/sdrD/sdrE</i>	5 (1.9)

MSCRAMMs; microbial surface components recognized adhesive matrix molecules.

Table 3 Results of testing 258 *Staphylococcus aureus* isolates for single pyrogenic toxin genes and some toxin gene combination (B) by PCR

Gene	No. of Isolates (%)
<i>sea</i>	–
<i>seb</i>	–
<i>sec</i>	1 (0.4)
<i>sed</i>	1 (0.4)
<i>see</i>	–
<i>tst-I</i>	7 (2.7)
<i>seb/sec/tst-I</i>	17 (6.6)
<i>sed/tst-I</i>	184 (71.3)
Not detected	48 (18.6)

Risultati

Table 4 Results of testing 258 *Staphylococcus aureus* isolates for single leukotoxin, haemolysin and autolysin genes, and some gene combination (5), by PCR

	No. of isolates (%)
Leukotoxin Gene	
<i>lukD-E</i>	1 (0.4)
<i>lukM</i>	20 (7.7)
<i>lukPV83</i>	5 (1.9)
<i>lukD-E/lukM</i>	5 (1.9)
<i>lukD-E/lukPV83</i>	18 (6.9)
<i>lukM/lukPV83</i>	33 (12.8)
<i>lukD-E/lukM/lukPV83</i>	159 (61.2)
Not detected	17 (6.6)
Hemolysin Gene	
<i>hly-β</i>	90 (34.9)
<i>hly-γ</i>	7 (2.7)
<i>hly-β/hly-γ</i>	123 (47.7)
Not detected	38 (14.7)
Autolysin Gene	
<i>atlA</i>	251 (97.3)
Not detected	7 (2.7)

- Alta prevalenza dei geni

❑ *atlA* (97.3%)

❑ *fib* (92.2%)

❑ *clfA* and B (82.5%)

❑ *fnbA* (72.8%)

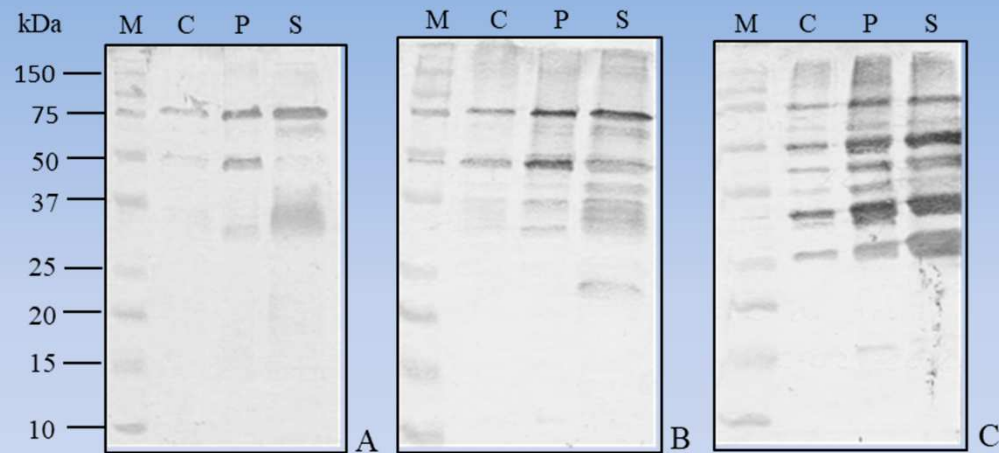
❑ *sdrC-SdrE* (75.9%)

❑ *sec-tsst* (71.3%)

❑ LukM-lukD/E-lukPV83 (61.6%)

Identificazione delle proteine immunogeniche

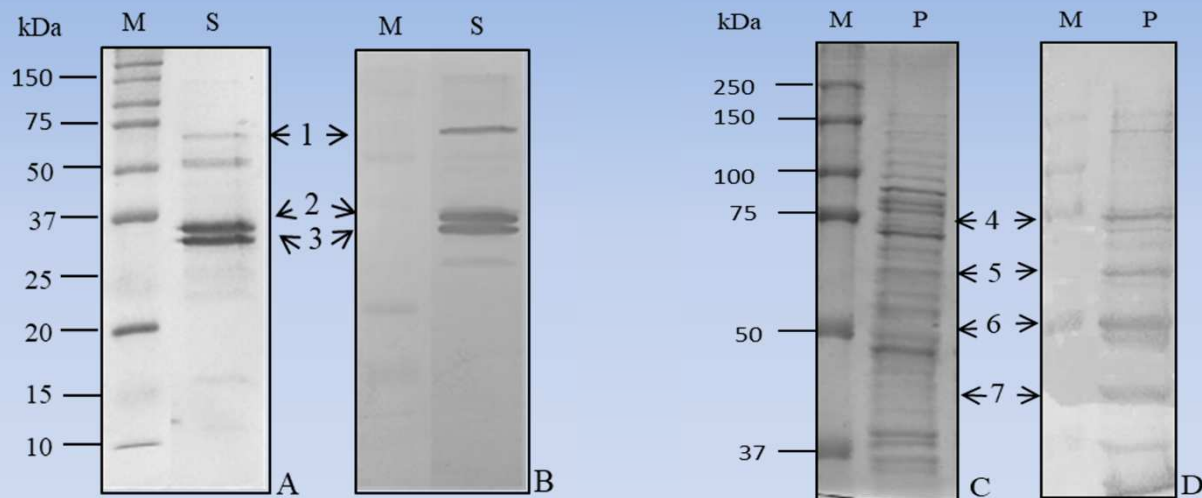
Prelievo di latte e sangue da pecore con mastite da *S. aureus*



Analisi mediante Western blot dei campioni di siero prelevati da pecore con mastite clinica da circa 6 (pannello A), 15 (pannello B) e 20 (pannello C) giorni. Gli antigeni estratti dalla coltura overnight di *S. aureus* (C), da pellet (P) e da surnatante (S) sono stati separati mediante SDS-PAGE in un gel di poliacrilammide al 12% in condizioni di denaturazione. M, marcatori di peso molecolare noto. Le masse molecolari sono indicate a sinistra.

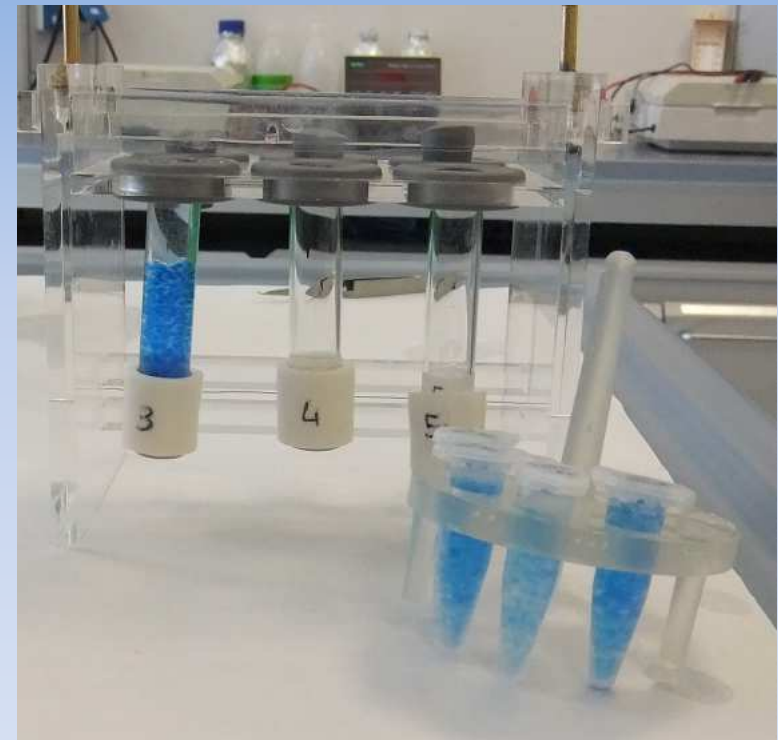
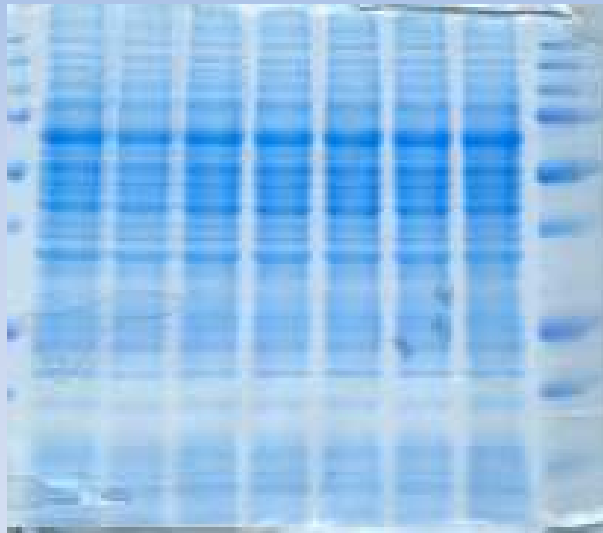
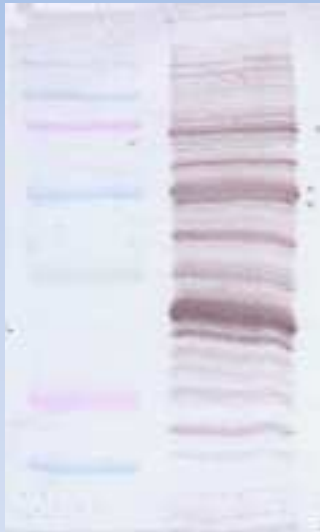
Collaborazione Azienda Agris Sardegna, Macomer

Identificazione delle proteine immunogeniche

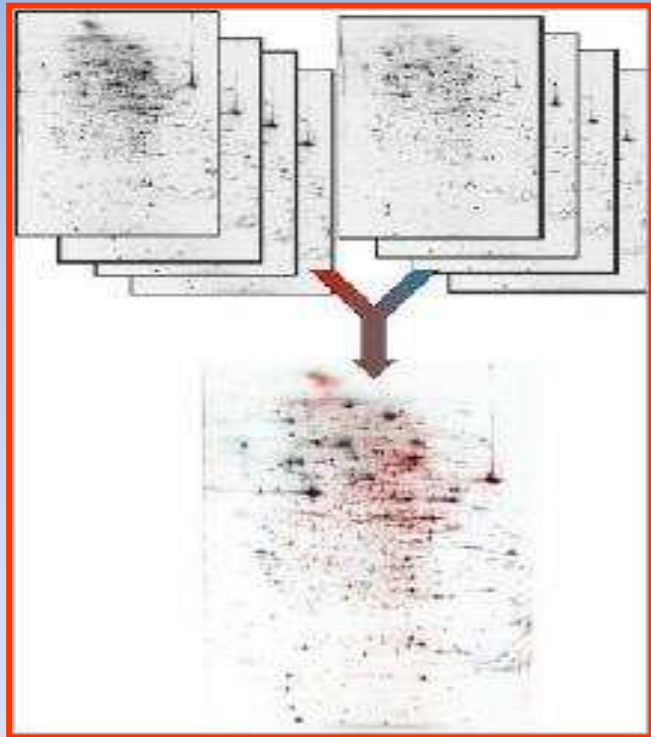


Analisi mediante Western blot (WB) di un campione di siero prelevato da una pecora con mastite clinica da circa 15 giorni. Separazione mediante SDS-PAGE delle proteine presenti nel surnatante concentrato (pannello A) e nel pellet cellulare (pannello C). WB mostra le proteine reattive 1, 2 e 3 del surnatante (pannello B) e le proteine 4, 5, 6 e 7 del pellet (pannello D). Le proteine immunoreattive sono indicate con le frecce. M, marcatori di peso molecolare. S, proteine secrete. P, pellet batterico. Le masse molecolari sono indicate a sinistra.

Concentrazione delle proteine immunogeniche



1) Sequenziamento delle proteine



<https://www.proteome-factory.com/index.php/en/>

2) Produzione dei sieri iperimmuni in agnello



Sperimentazione animale:
ai sensi dell'art. 31 del D. Lgs 26/2014
autorizzazione Ministero della Salute
DGSAF n° 869/2017-PR

Risultati del sequenziamento delle proteine

Protein N°	Protein name/	NCBI ID	Species	MW (kDa)	MASCOT score	Peptide match (sequence coverage, %)	PSORTb localization	PSORTb probability
1	Atl gene product	WP_001074519.1	<i>S. aureus</i>	137.44	2708	29%	Extracellular	9.98
2	LukF-PV(P83) precursor/ prophage phiPV83	gi 9,635,737	<i>S. aureus</i>	36.49	1396	51%	Extracellular	9.73
3	PreLukM	gi 577,649	<i>S. aureus</i>	34.98	1269	50%	Extracellular	9.73
4	Pyruvate kinase	WP_001232651.1	<i>S. aureus</i>	63.29	1637	45%	Cytoplasmic	7.50
5	Elongation Factor Tu	WP_001040568.1	<i>S. aureus</i>	43.13	1829	77%	Cytoplasmic	10.00
6	Dihydrolipoyl dehydrogenase	WP_000260115.1	<i>S. aureus</i>	49.57	776	31%	Cytoplasmic	9.97
7	Alpha-ketoacid dehydrogenase subunit beta	WP_000068170.1	<i>S. aureus</i>	35.23	1030	34%	Cytoplasmic	7.50



Contents lists available at ScienceDirect

Veterinary Microbiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/vetmic



Antimicrobial susceptibility and genotyping of *Staphylococcus aureus* isolates collected between 1986 and 2015 from ovine mastitis

Elisa Azara^a, Maria Giovanna Piras^a, Antonio Parisi^b, Sebastiana Tola^{a,*}

^a Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Sassari "G. Pegreff", 07100, Sassari, Italy

^b Istituto Zooprofilattico Sperimentale Puglia e Basilicata, 71121 Foggia, Italy



Journal of
Applied Microbiology



Journal of Applied Microbiology ISSN 1364-5072

ORIGINAL ARTICLE

Biofilm formation and virulence factor analysis of *Staphylococcus aureus* isolates collected from ovine mastitis

E. Azara, C. Longheu, G. Sanna and S. Tola

Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Sassari "G. Pegreff", Sassari, Italy

Veterinary Immunology and Immunopathology 230 (2020) 110149



Contents lists available at ScienceDirect

Veterinary Immunology and Immunopathology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/vetimm



Research paper

Identification of secreted and cellular antigens of *Staphylococcus aureus* causing dairy sheep mastitis and their potential for vaccine development

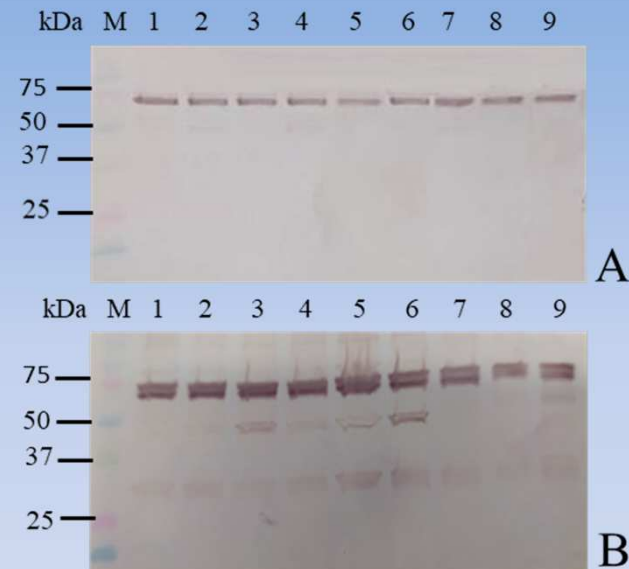
Carla Maria Longheu^a, Elisa Azara^a, Gavino Marogna^a, Maria Filippa Addis^b, Sebastiana Tola^{a,*}

^a Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna "G. Pegreff", Via Vennu 2, 07100, Sassari, Italy

^b Università degli Studi di Milano, Dipartimento di Medicina Veterinaria, Via dell'Università 6, 20131, Italy

Prima proteina analizzata: **AtIA**

- Sequenza completa: 1257 a.a. (137 kDa)
- Proteina multifunzionale, provvista di due domains generati mediante processi post-traduzionali:
- **AM** (amidasi, 62 kDa lega fibronectina, eparina e gelatina facilitando la colonizzazione e l'infezione) e **GM** (glucosaminidasi, 51 kDa)
- AM e GM attività idrolitica: tagliano il peptidoglicano in vari punti

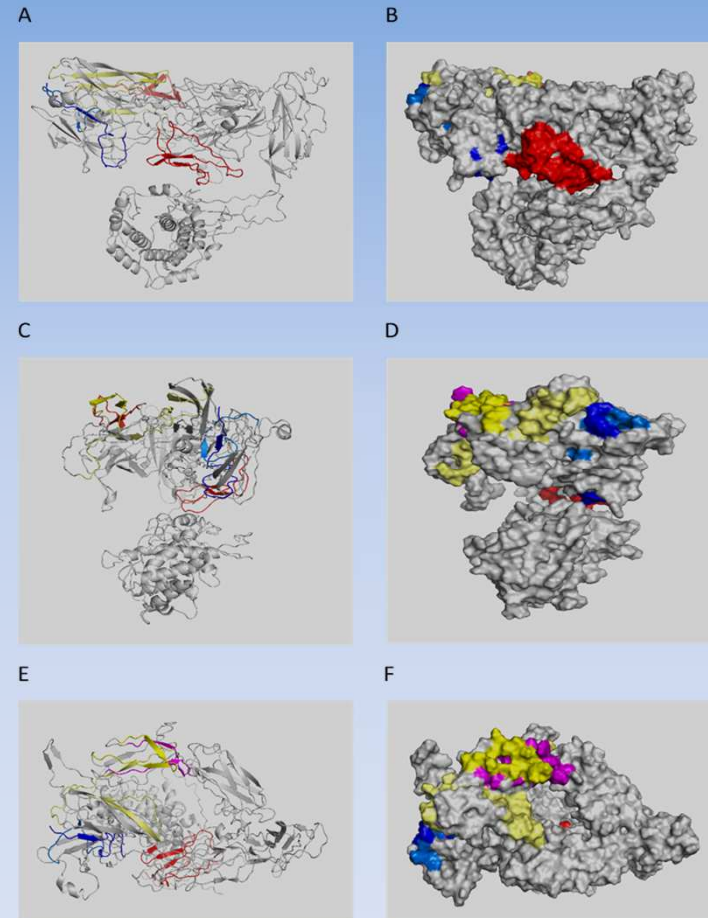


IB con siero anti-AtIA
A= proteine secrete
B= proteine cellulari

Prima proteina analizzata: AtIA

```

1  MAKKFNYKLPSMVALTLVGSVTAHQVQAAETTQDQTTNKNVLD SNKVKATTEQAKAEVKNPTQNISGTQ
71  VYQDPAIVQPKAANKTGNAQVNQKVDTTQVNGDTRATQSTTSNNAKPVTKSTNTTAPKTNNNVTSAGYSL
141  VDDEDDNSENQINPELIKSAAKPAALETQYKAAAPKATPVAPKAKTEATPKVTTFSASAQPRSAAPKT
211  SLPKYKQVNSSINDYIRKNNLKAPKIEEDYTSYFPKYAYRNGVGRPEGIVVHDTANDRSTINGEISYMK
281  NNYQNAFVHAFVDGDRIIETAPDYLWVGAVGNPRF INVEIVHHDYASFARSMNNYADYAATQLQYY
351  GLKPDSAEYDNGTVWTHYAVSKYLGTDHADPHGYLRSHNYSYDQLYDLINKEYLIKMGKVAPWGTQST
421  TPTTPSKPSTPSKPSTPSTGKLTVAANNGVAQIKPTNSGLYTTVYDKTGKATNEVQKTFVAVSKATILGN
491  QKFYLVQDYNSGNKFGWKEGDVVYNTAKSPVNVNQSYSIKPGTKLYTVPWGTSKQVAGSVSGSNQTFK
561  ASKQQQIDKSIYLYGSVNGKSGWVSKAYLVDATAKPTPTPKPSTPTTNKLTVSSLNGVAQINAKNNGL
631  FTTVYDKTGKPTKEVQKTFVAVTKEASLGKNFYLVKDYNSPTLIGWVKQGDVIYNNAKSPVNMQTYTVK
701  PGTKLYSVPWGTYKQEGAVSGTGNQTFKATKQQQIDKSIYLYGTVNGKSGWISKAYLAVPAAPKKAVAQ
771  PKTAVKAYAVTKPQTQTQVSKIAQVKPNNTGIRASVYEKAKNGAKYADRTFYVTKERAHGNETYVLLNN
841  TSHNIPLGWFNVKDLNVQNLGKEVKTTQKYTVNRSNGLSMVPWGTKNQVILTGNNIAQGTFNATKQVSV
911  GKDVYLYGTINNRTGWVNSKDLTAPTAVKPTTSAAKDNYTYVIKNGNGYYYVTPNSDTAKYSLKAFNEQ
981  PFAVVKEQVINGQTWYYGKLSNGKLAWIKSTD LAKELIKYNQIGMTLNQVAQIQAGLQYKPQVQRPQGW
1051  TDANFNDVKHAMDTKRLAQDPALKYQFLRLDQPQNISIDKINQFLKGGKGVLENQGAAPNKAQMYGINEV
1121  YLISHALLETGNGTSQLAGADVNNKVVTNSNTKYHNVFIAAYDNDPLREGIKYAKAGWDVTSKAIV
1191  GGAKFIGNSYVKAGQNTLYKMRWNPAPGTHQYATDWDWANINAKIIGYDYKIGEVGKYFDIPQYK
    
```



Ribbon diagram (A, C, E) and orthographic molecular surface representation (B, D, F) of AtI protein complete sequence (1257 aa) and spatial position of selected top scoring epitopes

Costruzione di primers con “codine”

Rispetto dell'ORF e della
direzionalità

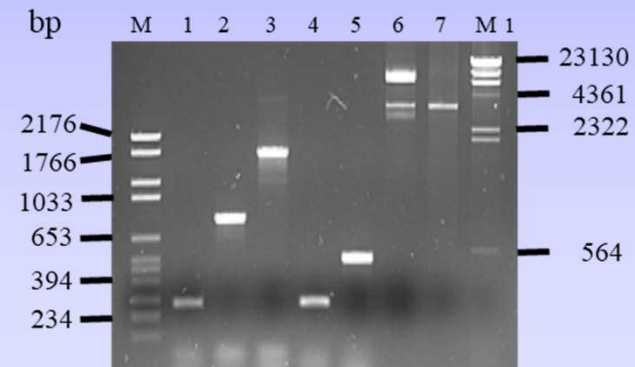
inizio gene

5'-GGAATACAAAGGAATGGGCGACAAGGACAACATAGAG-3'

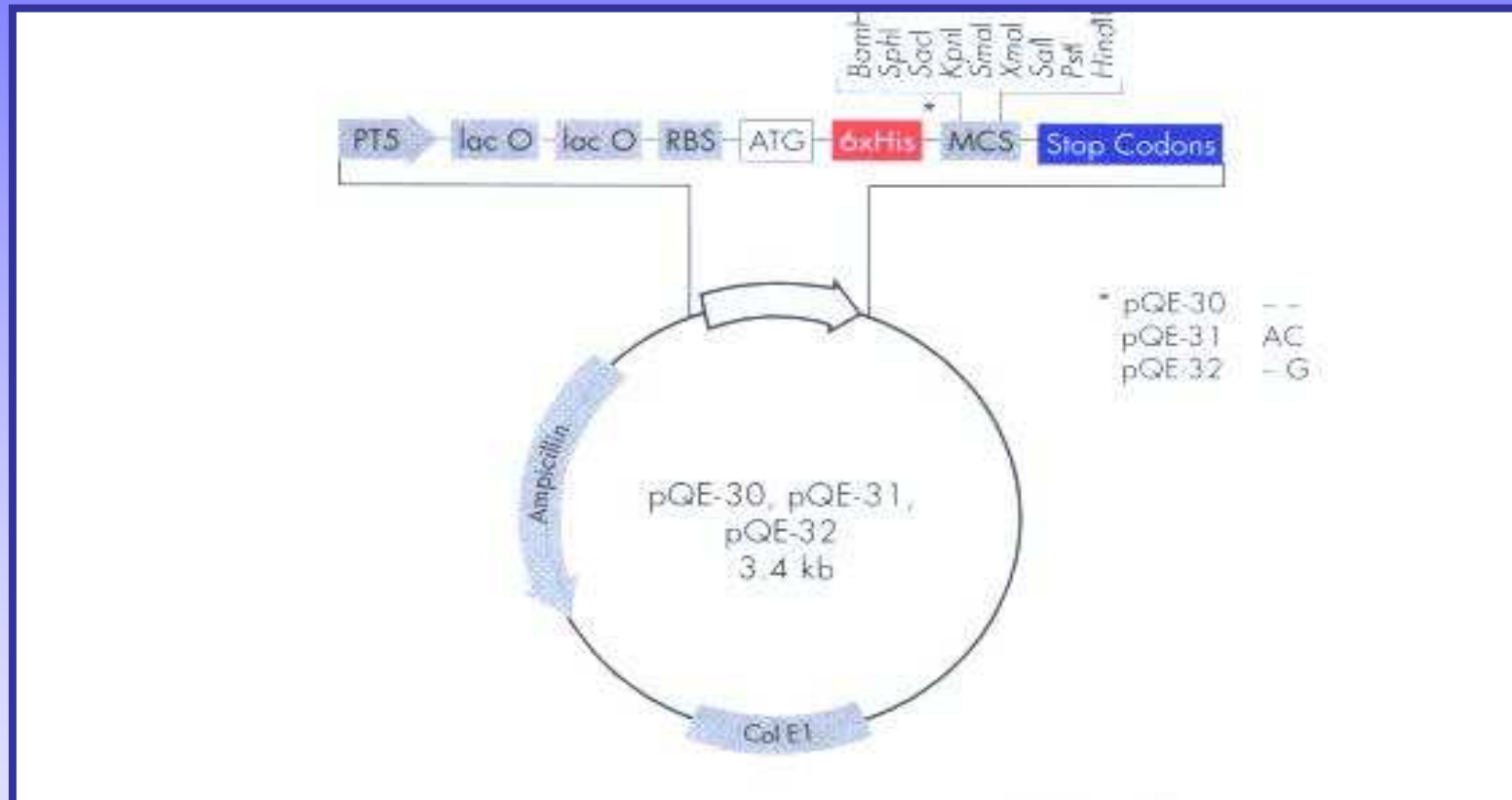


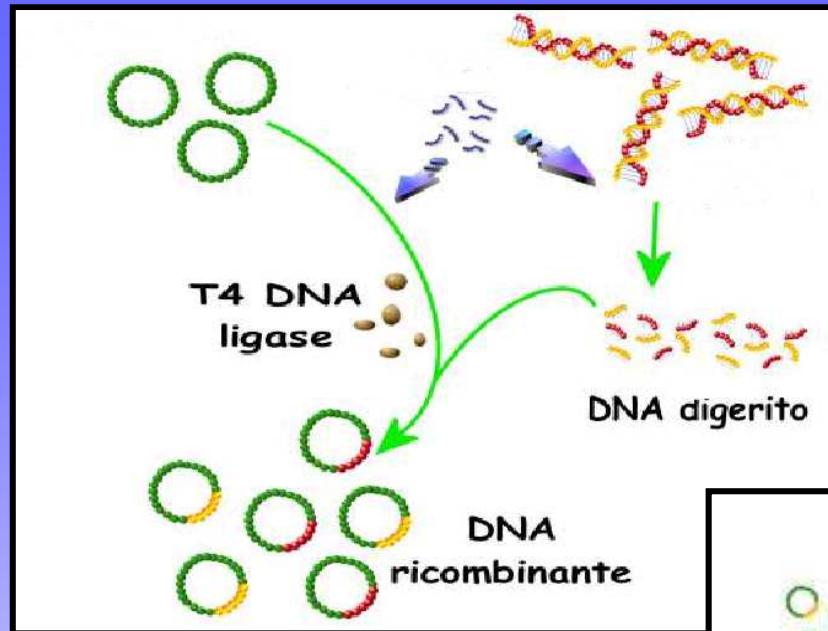
*Bam*HI

ATGGGCGACAAGGA

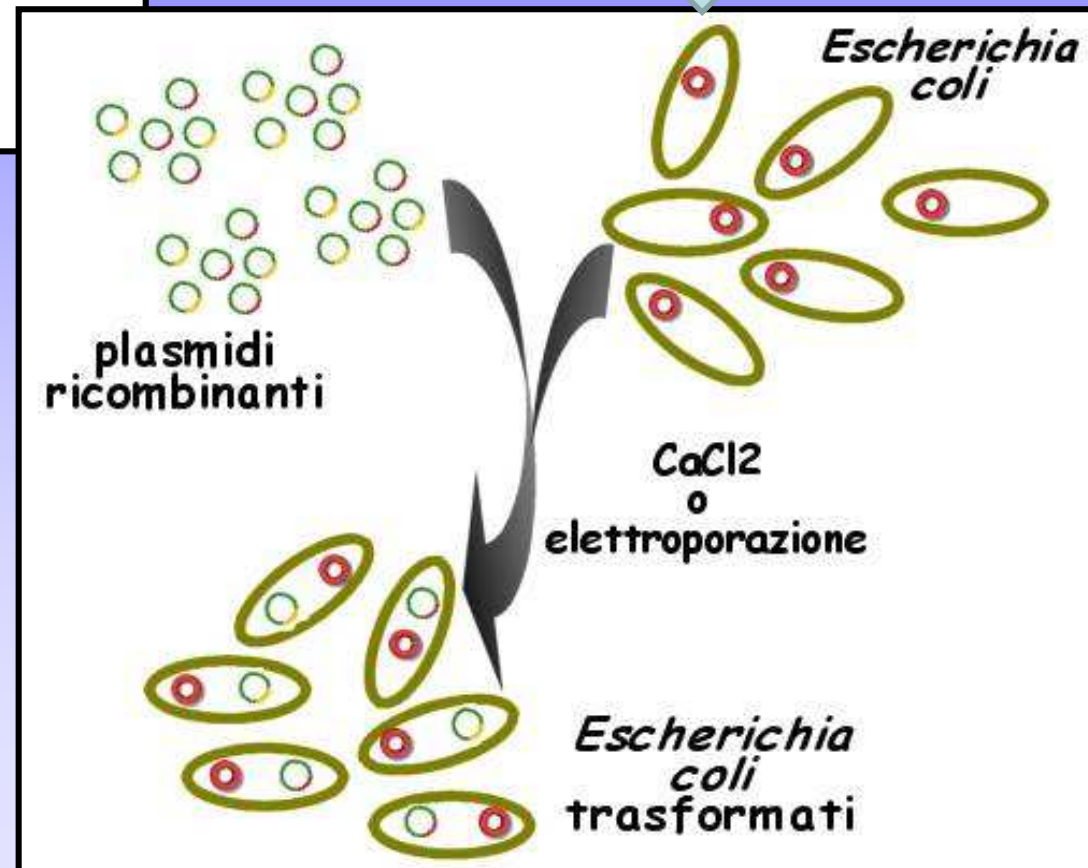


Plasmide per il clonaggio

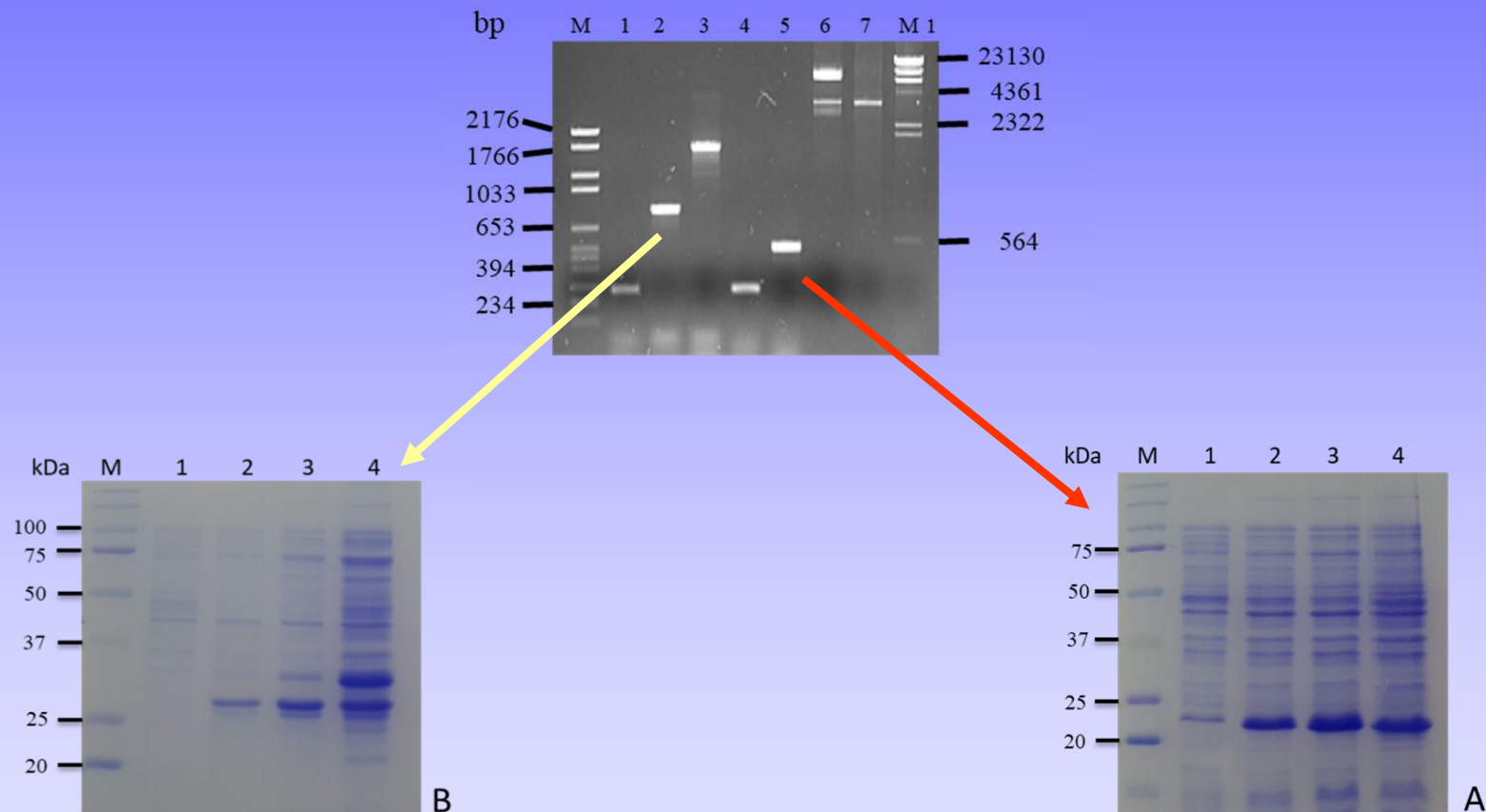




DH5 α + plasmide regolatore pREP



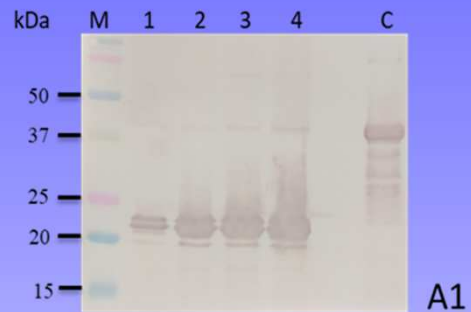
Induzione degli *E. coli* ricombinanti con IPTG



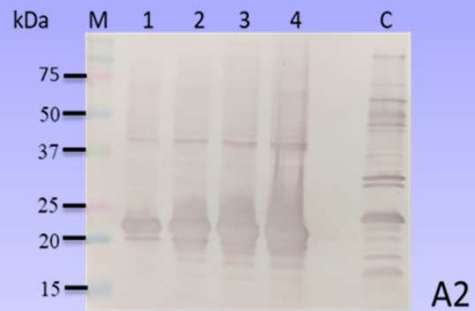
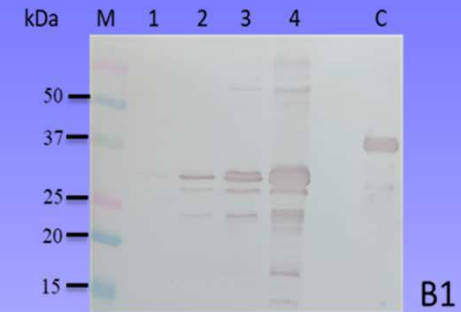
Clone con inserto da 753-bp

Clone con inserto da 492-bp

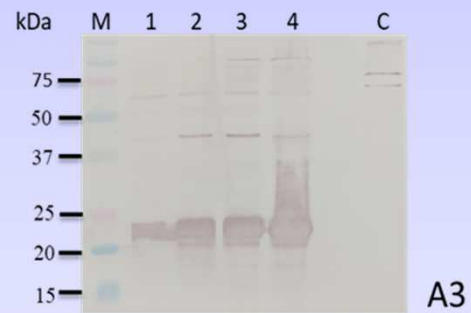
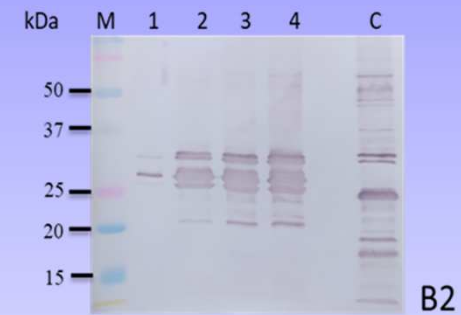
IB dei cloni ricombinanti



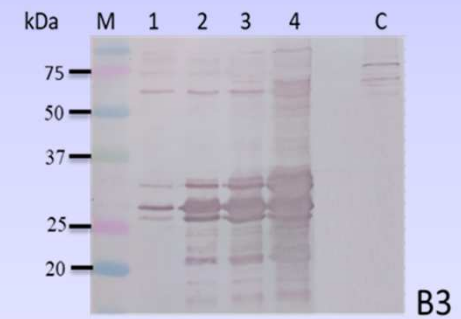
Siero anti-6His



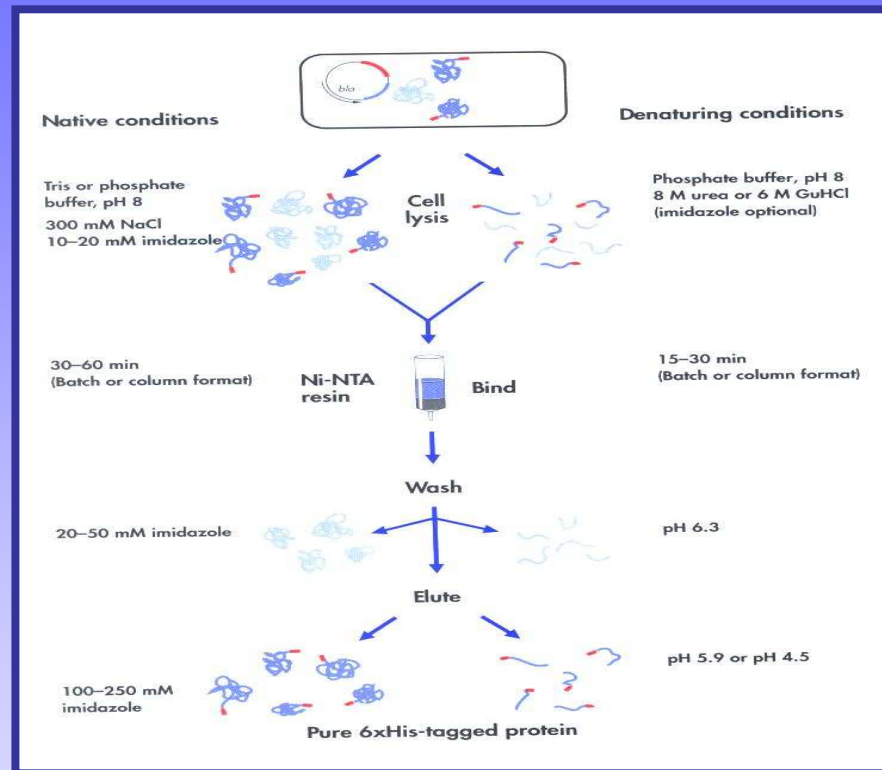
Siero da campo



Siero iperimmune



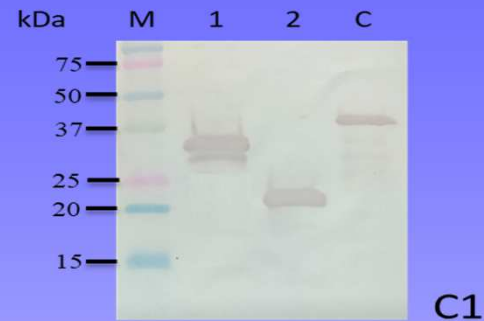
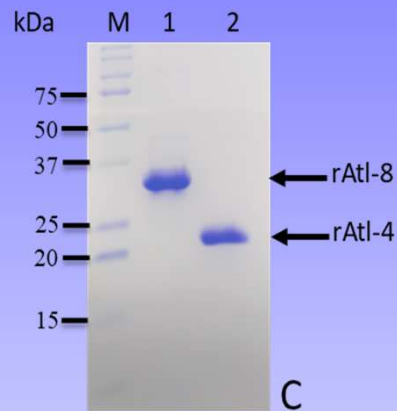
Purificazione



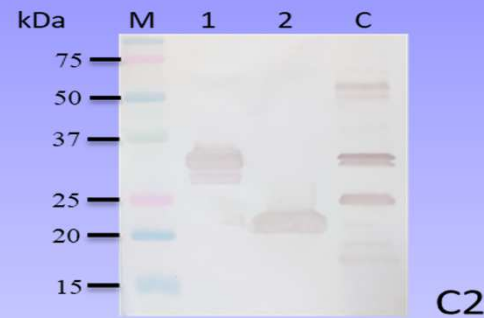
Verifica della presenza del tag di 6His



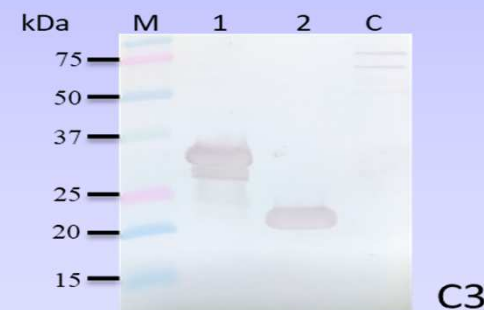
Analisi delle proteine ricombinanti



Siero anti-6His



Siero da campo



Siero iperimmune

Azara E., Longheu C.M., Foddai A., Addis M.F., Tola S.
Computational analysis of the major antigen autolysin A of *Staphylococcus aureus* isolated from sheep milk and its potential for protein-based vaccine development. *Frontiers in Veterinary Science*

Grazie
per l'attenzione!

sebastiana.tola@izs-sardegna.it