

Applicazione della elettroforesi pulsata (PFGE) a stipti meticillino-resistenti di *Staphylococcus aureus* isolati dall'uomo e dagli animali

Application of pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) to methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus* from humans and domestic animals

Vincenzo Cuteri¹, Rosanna Mazzolla², Fabrizio Valente³,
Lucio Merletti², Carlo Valente⁴

¹Dipartimento di Scienze Veterinarie - Facoltà di Medicina Veterinaria, Matelica (MC)

²Dipartimento di Medicina Sperimentale e Scienze Biochimiche, Sez. Microbiologia, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Perugia

³Scuola di Specializzazione in Nefrologia, Università degli Studi di Perugia, Perugia

⁴Dipartimento di Tecnologie e Biotecnologie delle Produzioni Animali - Sez. Malattie Infettive, Facoltà di Medicina Veterinaria, Perugia

INTRODUZIONE

La presenza di *Staphylococcus aureus* meticillino-resistente (MRSA), in medicina, è stata segnalata poco dopo che la meticillina era stata introdotta nella clinica per la cura di infezioni sostenute da tali microrganismi [1]. La capacità colonizzante e l'attiva moltiplicazione degli stafilococchi rappresentano caratteri di virulenza. I fattori di rischio che contribuiscono all'attecchimento dell'infezione sono rappresentati dalla lentezza della guarigione di alcune infezioni ricorrenti, da trattamenti antibiotici prolungati, da utilizzazione di cateteri ed ancora dalla presenza di ferite [2]. *S. aureus* è uno dei più frequenti agenti responsabile di mastite nella bovina da latte [3, 4], nella pecora e nella capra ed inoltre è spesso coinvolto in infezioni cutanee nel suino ed in altre specie animali [5].

Nell'uomo *S. aureus* è il principale agente eziologico delle infezioni purulente localizzate a carico dei tessuti molli, delle ossa e di altri organi. È responsabile soprattutto di infezioni di natura esogena in funzione della sua capacità di diffondere nell'ambiente causando così epidemie in comunità chiuse come ospedali, case di cura e scuole [6, 7, 8]. Il microrganismo, in determinate condizioni, esprime una elevata viru-

lenza in grado di esasperare il processo infiammatorio fino a portare a morte l'ospite.

Durante il trattamento terapeutico delle infezioni da stafilococchi con meticillina e β -lattamici in generale, può verificarsi l'insorgenza di ceppi meticillino-resistenti tanto che sono stati segnalati MRSA nel cane [9], nel cavallo e nelle bovine da latte [4].

Nell'uomo i ceppi MRSA sono temibili patogeni specialmente in campo ospedaliero ed innumerevoli sono le epidemie riportate in bibliografia [7]. Recentemente è stato dimostrato che le vie di trasmissione possono essere prevalentemente due, una diretta da paziente a paziente e l'altra, indiretta, tramite il personale sanitario [10, 7].

La resistenza alla meticillina insorge per la presenza del gene *mecA* che codifica per una Penicillin Binding Protein (PBP2a) che ha una bassa affinità per i composti β -lattamici [11]. La resistenza a meticillina e oxacillina, antibiotico simile di frequente impiego in patologia veterinaria, è solitamente associata ad un analogo comportamento nei confronti di un elevato range di antibiotici [12] tanto da poter compromettere gli interventi terapeutici che, relativamente alla mastite bovina, rappresentano il metodo più efficace per il controllo della malattia. Gli isolati MRSA, nell'uomo, sono stati segna-

lati, negli ospedali europei sin dagli anni '60, diffondendo poi anche in ambiente extra ospedaliero [13] tanto che, allo stato attuale, il 25% dei ceppi di *S. aureus* che causano infezioni nosocomiali sono stipiti MRSA.

Lo scopo di questa indagine è stato quello di individuare la presenza di ceppi MRSA isolati sia da campioni umani che animali e di sottoporre tali stipiti ad indagine molecolare del DNA cromosomico tramite PFGE.

■ MATERIALI E METODI

Stipiti batterici

Dal secreto mammario di bovine con mastite subclinica, nel periodo compreso tra 1996-1999, sono stati isolati 223 stipiti di *Staphylococcus aureus*. Da pazienti ricoverati nei diversi reparti dell'Ospedale di Perugia, nel periodo compreso tra 1984-1998, sono stati scelti, tra gli isolati, 83 stipiti di *S. aureus*.

Il materiale patologico veniva seminato in Nutrient Agar con aggiunta di sangue ovino al 5% ed in Mannitol Salt Agar (Oxoid, Milano). I microrganismi isolati sono stati identificati mediante tests della coagulasi e Dnasi, API Staph (bioMérieux, France) e Sceptor System (Becton Dickinson).

Staphylococcus aureus ATCC 25923 e ATCC 8325 sono stati utilizzati in tutte le prove come stipiti di referenza.

Meticillino-resistenza

Gli stipiti sono stati coltivati in Mueller Hinton Agar (Oxoid, Milano). Successivamente venivano prelevate 4-5 colonie isolate e seminate in Nutrient Broth (Oxoid, Milano) fino a raggiungere la torbidità di 0.5 McFarland in 2-8 ore circa a 37°C. Una aliquota, 0.01 ml, veniva diluita in 10 ml di soluzione salina e 3 ml venivano distribuiti sulla superficie di una piastra Mueller Hinton Agar [14] sulla quale venivano poste le strisce di nitrocellulosa contenenti Meticillina (E-test, Oxoid, Milano) per la determinazione della Concentrazione Minima Inibente (MIC) espressa in µg/ml. Le colture venivano incubate a 35°C per 24 ore e gli stipiti di *S. aureus* venivano considerati resistenti (MRSA) se presentavano una inibizione uguale o superiore a 16 µg/ml.

La presenza del gene *mecA* è stata evidenziata mediante PCR [15].

La purificazione del DNA è stata ottenuta mediante QIAmp tissue Kit (Quiagen, Hilden,

Germany). L'amplificazione del gene *mecA* è stata realizzata con l'impiego dei primers *mecA1* (5'-AAA ATC GAT GGT AAA GGT TGG C) e *mecA2* (5'- AGT TCT GCA GTA CCG GAT TTG C) che evidenziano un prodotto di PCR di 533bp [16]. L'amplificazione del DNA è stata eseguita secondo quanto descritto da Ungeheuer nel 1994 [17].

L'elettroforesi del DNA è stata realizzata su gel di agarosio 2% e sottoposta a colorazione con etidio-bromuro e fotografata sotto esposizione di una luce a raggi UV.

Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)

Gli stipiti MRSA sono stati caratterizzati con il metodo della macrorestrizione con *Sma* I (Celbio, Milano) risolta mediante elettroforesi pulsata [18]. I batteri venivano fatti sviluppare in 10 ml di Trypticase Soy Broth (Oxoid, Milano) a 37° per 24 ore, centrifugati a 2000 g per 10 minuti ed il pellet ottenuto risospeso in PIV buffer [NaCl 1M, Tris-HCl 10mM, pH 7.6 (Celbio-Pierce, Milano)]. Una aliquota di 0.5 ml, di quest'ultima sospensione, veniva mescolata ad una uguale quantità di Incert Agarose (low melting) 1% (FMC - SPA div. BIOSPA, Milano) per l'allestimento dei plugs. Ad ogni plug veniva aggiunto 1 ml di soluzione di lisi [Tris-HCl 10 mM, pH 7.5, NaCl 50 mM, EDTA 100 mM, pH 7.5, Na-Deoxycholate 0.2%, Na-lauroyl-sarcosina 0.5%, Lysozima 5mg/ml, Lyso-staphin 25 µl/ml (Sigma-Aldrich, Milano)] e venivano posti ad incubare a 37°C per 24 ore in agitazione. La soluzione di lisi veniva sostituita con un tampone di digestione proteica [EDTA 0.5 M, pH 8.0, Na-lauroyl-sarcosina 1%, Proteinasi K 0.5 mg/ml (Sigma-Aldrich, Milano)] e posta ad incubare a 50°C per 48 ore sotto agitazione. I plugs venivano lavati con TE [Tris HCl 10 mM, pH 7.5, EDTA 1mM, pH 8.0] e PMSF [Phenyl-methyl-sulphonyl-fluoride (Celbio, Milano) 20 mg/ml in isopropanolo] e ancora tre volte con TE. In seguito i plugs venivano sottoposti a digestione enzimatica in una miscela di H₂O sterile, spermidina (1 mM), *Sma*I 100U (Celbio, Milano) per un volume finale di 250 µl, per 24 ore circa a 25°C ed utilizzati per l'elettroforesi pulsata su gel di agarosio 1% Fast Lane (FMC - SPA div. BIOSPA, Milano) a 14°C in tampone TBE (Tris-Borato EDTA, pH 8.5) autoalgoritmo per 24 ore. Lo standard usato era Lambda Ladder (Biorad Lab., Hercules, Ca, USA). La PFGE veniva effettuata con il sistema CHEF Mapper (Biorad Lab., Hercules, Ca, USA). I patterns

elettroforetici sono stati acquisiti mediante telecamera (Gel-Doc 1000, Biorad Lab.) nel software Molecular Analyst Finger Printing (Biorad) e analizzati con il programma MA Fingerprinting (Biorad Lab.) per generare un dendrogramma di similarità [18].

I coefficienti di similarità (S_{AB}) venivano calcolati direttamente dal software. I S_{AB} andavano da 0 ad 1, dove 0 indicava che i patterns non erano correlati e 1 che i patterns erano strettamente correlati.

RISULTATI

I 306 isolati di *Staphylococcus aureus* presentavano caratteri chimico-metabolici omogenei.

Dei 223 stipiti esaminati, provenienti dalla patologia veterinaria, 32 (14.34%) hanno espresso resistenza a meticillina mentre degli 83 stipiti di origine umana, 53 (63.8%) erano MRSA.

Quaranta stipiti MRSA e 20 MSSA, derivanti in parti uguali dalla patologia umana e veterinaria, nei quali è stata verificata la presenza del gene *mecA* mediante PCR allo scopo di confermare i risultati ottenuti con E-test e Sceptor System, sono stati sottoposti a PFGE.

In seguito ai risultati della PFGE, lo studio della similarità genomica degli stipiti MRSA, visualizzato mediante dendrogramma (Figg. 1 e 2), ha mostrato che i ceppi di origine umana e veterinaria erano diversi. Gli isolati provenienti dall'uomo esprimevano, tra loro, una elevata similarità mentre tra gli stipiti di origine animale solo due ceppi erano risultati identici (Tabella 1).

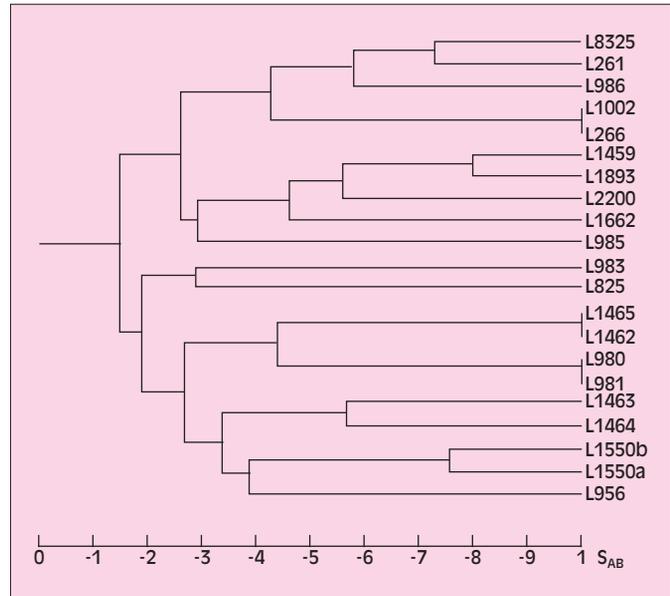


Figura 1 - *Staphylococcus aureus* (MRSA) di origine umana: dendrogramma di similarità.

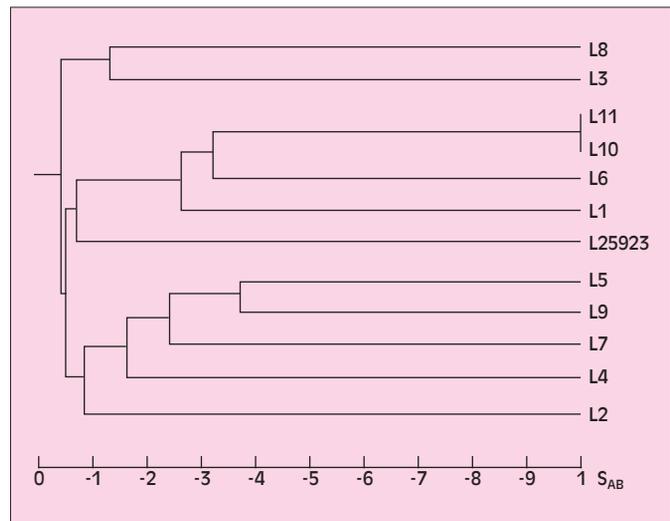


Figura 2 - *Staphylococcus aureus* (MRSA) di origine animale: dendrogramma di similarità.

Tabella 1 - *Staphylococcus aureus*: similarità genomica degli isolati dalla patologia umana ed animale.

	Indistinguibili	Strettamente correlati	Probabilmente correlati	Non correlati	Totale
MRSA					
Isolati umani	6	6	6	2	20
Isolati animali	2	2	0	16	20
MSSA					
Isolati umani	2	3	2	3	10
Isolati animali	0	2	2	6	10

■ CONCLUSIONI

Uno dei microrganismi maggiormente diffuso in natura e responsabile di malattie, sia nell'uomo che negli animali, è *Staphylococcus aureus* capace di indurre infezioni spesso di difficile soluzione in sede di terapia [19]. L'uso indiscriminato degli antibiotici ha indotto *Staphylococcus aureus* a modificare la sua struttura genomica e a produrre da parte del gene *mecA* una proteina, PBP2a, a bassissima affinità per gli antibiotici β -lattamici con conseguente comparsa di stipiti meticillino-resistenti [20, 18]. Uno dei problemi da affrontare è la scelta di un metodo di identificazione degli stipiti di stafilococco. I ceppi MRSA non sono facilmente identificabili neppure con il set internazionale di fagi e si è pertanto ritenuto opportuno sostituire le metodiche convenzionali con quelle di biologia molecolare, come la PFGE o la reazione a catena della polimerasi, che utilizzando i primers *mecA1* e *mecA2*, identifica una sequenza di 533 bp, specifica per gli stipiti MRSA [14].

Poiché in patologia umana è stato verificato che stipiti MRSA provenienti da continenti diversi erano classificati indistinguibili [21, 22] è stato ritenuto opportuno confrontare stipiti di origine umana e veterinaria, nello stesso contesto territoriale, per verificare se si fossero realizzate le stesse condizioni.

Gli stipiti di origine animale provenivano da allevamenti dislocati in territori diversi e tale situazione non giustifica l'assenza di similarità genomica tra loro poiché, in medicina umana, stipiti MRSA classificati indistinguibili, sono stati rinvenuti anche a distanze notevoli [21, 22]. Nello studio comparativo effettuato tra i 40 stipiti MRSA ed i 20 MSSA non esiste alcuna similarità genomica così come non sono state evidenziate analogie tra gli stipiti MRSA provenienti dalla patologia veterinaria ed umana.

I risultati hanno consentito di evidenziare solo due stipiti MRSA di origine veterinaria che potessero essere considerati geneticamente identici e altri due strettamente correlati mentre in patologia umana gli stipiti indistinguibili (n. 6)

e strettamente correlati (n. 6) hanno fatto ipotizzare la presenza di un clone dominante in quanto esiste una stretta correlazione tra ceppi isolati in anni, reparti e pazienti diversi tanto che uno stipite del 1984 è risultato geneticamente identico ad un isolato nel 1991.

Al di là delle similarità genomiche le problematiche della meticillino resistenza interessano indifferentemente entrambe le patologie, veterinaria e umana.

L'elettroforesi pulsata viene considerata da molti autori il *gold standard* per la tipizzazione molecolare di un ampio range di microrganismi e per numerosi batteri patogeni si è dimostrata altamente discriminatoria e paragonabile, se non superiore, ad altri metodi [16, 18, 4].

I risultati dell'indagine, pur condizionati da un numero modesto di stipiti, confermano la presenza di MRSA nel bovino e mostrano la grande variabilità genomica anche all'interno di ceppi meticillino-resistenti i quali potrebbero diffondere dagli animali nell'ambiente coinvolgendo altri animali oltre l'uomo [20]. Inoltre, sempre a dimostrazione della complessa struttura somatica di *S. aureus*, si rileva un comportamento opposto tra la omogeneità espressa dall'analisi chimico-metabolica e la disuguaglianza genomica, che rappresenta l'elemento che meglio caratterizza il batterio.

Dallo studio degli MRSA provenienti da vari reparti ospedalieri risulta che esiste una elevata omologia tra alcuni stipiti da far supporre l'esistenza di un clone comune da cui potrebbero derivare gli isolati. Tale clone è prevalente, da almeno 15 anni, nell'Ospedale Monteluca di Perugia dove determina epidemie ricorrenti (dati non pubblicati) tanto da ipotizzare una colonizzazione del personale sanitario che fungerebbe in tal modo da serbatoio e da veicolo.

Lo studio molecolare dei ceppi MRSA sottolinea la necessità di intraprendere misure atte a monitorare gli isolati clinici in modo da poter intervenire con efficacia per interrompere la catena epidemiologica.

Key words: *Staphylococcus*, MRSA, PFGE.

RIASSUNTO

Obiettivi: La ricerca si è proposta di verificare la presenza di stipiti di *Staphylococcus aureus* meticillino-resistenti (MRSA) nel bovino e nell'uomo e studiare le relazioni genomiche mediante il confronto dei pattern di restrizione del DNA.

Metodi: Dagli animali e dall'uomo sono stati isolati rispettivamente 223 e 83 stipiti di *S. aureus*, e testati nei confronti di meticillina con E-test. I ceppi MRSA venivano caratterizzati con il metodo della macrorestrizione con *Sma*I risolta mediante elettroforesi pulsata (PFGE).

Risultati: Trentadue (14.34%) isolati di origine animale e 53 (63.8%) di origine umana erano resistenti a meticillina. La PFGE ha mostrato che i ceppi di origine veterinaria ed umana

erano diversi. Gli isolati provenienti dall'uomo esprimevano, tra loro, una elevata similarità mentre tra gli stipiti di provenienza animale solo due erano identici.

Conclusioni: La meticillino-resistenza interessa indifferentemente sia la patologia veterinaria che umana. Gli MRSA di origine umana sono, in percentuale, superiori a quelli di origine animale. Gli isolati dal bovino mostrano una grande variabilità genomica mentre, in patologia umana, le numerose correlazioni fanno supporre la presenza di un clone dominante. La PFGE si può considerare una metodica di riferimento per la tipizzazione molecolare e lo studio epidemiologico di MRSA.

SUMMARY

Background: The aim of the research was to isolate and to identify the methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains from cattle and human and to determine their genetic relatedness comparing the DNA restriction patterns.

Methods: Strains of *Staphylococcus aureus* were isolated from animals (223 strains) and humans (83). The E-test was applied to determine methicillin-resistance. The restriction patterns of DNA were carried out with pulsed field gel electrophoresis (PFGE).

Results: Thirty two (14.34%) from animals and 53 (63.8%) from men strains of *S. aureus* showed resistance to methicillin. PFGE demonstrated that

the strains from human and veterinary pathology are different. The microorganisms isolated from men revealed, among them, a high similarity while only two strains, from animals, were considered identical.

Conclusions: The resistance to methicillin involved both human and veterinary pathology. The human MRSA strains were higher than the animals ones. The strains isolated from animals showed a large genomic variability while in man the number of indistinguishable microorganisms, induces to suppose the existence of a prevalent clone. PFGE could be considered the gold standard for molecular characterisation of MRSA isolates.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Barber M. Methicillin-resistant staphylococci. *J. Clin. Pathol.* 14, 385-393, 1961.
- [2] Meakins J.L., Wicklund B., Forse R.A., McLean A. P. The surgical intensive care unit: current concepts in infection. *Surg. Clin. North Am.* 60, 117-132, 1980.
- [3] Devriese L.A. Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in dairy herds. *Res. Vet. Sci.* 19, 23-27, 1975.
- [4] Zadoks R., van Leeuwen W., Barkema H., et al. Application of pulsed-field gel electrophoresis and binary typing as tools in veterinary clinical microbiology and molecular epidemiologic analysis of bovine and human *Staphylococcus aureus* isolates. *J. Clin. Microbiol.* 38, 1931-1939, 2000.
- [5] Scott G.M., Thompson R., Malone-Lee J., Ridgeway G.L. Cross-infection between animals and man: possible feline transmission of *Staphylococcus aureus* infection in human. *J. Hosp. Infect.* 12, 29-34, 1988.
- [6] Allen K.D., Anson J.J., Parsons L.A., Frost H.G. Staff carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (EMRSA-15) and the home environment: a case report. *J. Hosp. Infect.* 35, 307-311, 1997.
- [7] Emmerson M. Nosocomial staphylococcal outbreaks. *Scand. J. Infect Dis. Suppl.* 93, 47-54, 1994.
- [8] Fraiese A.P., O' Brien S.J., Oldfield K., Wise R. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in nursing home in a major UK city: an anonymised point prevalence survey. *Epidemiol. Infect.* 118, 1-5, 1997.
- [9] Tomlin J., Pead M.J., Lloyd D.H., et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection in 11 dogs. *Vet. Rec.* 16, 60-64, 1999.
- [10] Cox R.A., Conquest C. Strategies for the management of healthcare staff colonised with epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Hosp. Infect.* 35, 117-127, 1997.

- [11] Hussain Z., Stoakes L., Garrow S., Longo S., Fitzgerald V., Lannigan R. Rapid detection of mecA-Positive and mecA-Negative coagulase negative staphylococci by an anti-penicillin binding protein 2a slide latex agglutination test. *J. Clin. Microbiol.* 38, 2051-2054, 2000.
- [12] Barie P.S. Antibiotic resistant gram positive cocci: implications for surgical practice. *World J. Surg.* 22, 118-126, 1998.
- [13] Francisco M., Crisp C., Jorgensen J.H., Patterson J.E. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a community organism. *Clin. Inf. Dis.* 21, 1308-1312, 1995.
- [14] Kampf G., Weist K., Kegel M., Swidsinski S., Ruden H. Comparison of screening methods to identify methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 16, 301-307, 1997.
- [15] Murakami K., Minamide W., Wada K., Nakamura E., Teraoka H., Watanabe S., Identification of Methicillin-Resistant strains of staphylococci by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 29, 2240-2244, 1991
- [16] Murray R., Baron E.J., Tenover F.C., Tenover F.C. "Manual of Clinical Microbiology" 7th ed., 190-208, 1995.
- [17] Ungeheuer J., Wilms S., Sietzen W. MecA-Gen bei Staphylokokken-vereinfachter Nachweis mit der PCR. *Chemoter. J.* 1, 31-35, 1994.
- [18] Tenover F.C., Arbeit R.D., Goering R.V., et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.* 33, 2233-2239, 1995.
- [19] Cefai C., Ashurst S., Owens C. Human carriage of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* with linked with a pet dog. *Lancet* 344, 539-540, 1994.
- [20] Levy S.B. Drug resistance: the new apocalypse. *Microbiology* 2, 10-16, 1994.
- [21] Mato R., Santos Sanchez I., Venditti M., Platt D.J., Brown A., de Lencastre H. Spread of the multiresistant Iberian clone of methicillin resistant *S. aureus* to Italy and Scotland. *Microb. Drug Resist.* 28, 107-112, 1998.
- [22] Texeira L., Resende C.A., Ormonde L.R., et al. Geographic spread of epidemic multiresistant *S. aureus* clone in Brazil. *J. Clin. Microbiol.* 33, 2400-2404, 1995.