

Evaluation of GeneXpert® system for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in clinical samples

Antonella Mencacci, Luca Merlini, Marta Meucci, Mariolina Vitali, Senia Farinelli, Maria Rita Pagliochini, Francesco Bistoni, Alessandra Sensini

Sezione di Microbiologia, Dipartimento di Medicina Sperimentale e Scienze Biochimiche, Università di Perugia, Perugia, S.C. Microbiologia, Ospedale "S. Maria della Misericordia", Perugia

Key words: GeneXpert system, MRSA, mecA gene.

Valutazione del sistema GeneXpert® per la rilevazione di *Staphylococcus aureus* meticillino-resistente in campioni clinici

SUMMARY

Infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains (MRSA) have reached epidemic proportions globally, being the major cause of nosocomial infections. Rapid identification of MRSA in nasal swabs or in clinical samples is considered a useful strategy for control and treatment of these infections. GeneXpert system (Cepheid Europe, Vira-Soleich, Maurence-Scopont-France) can detect by real-time PCR in approximately one hour methicillin-resistant *S. aureus* or coagulase-negative staphylococci (CoNS) in clinical samples, in comparison with 24 hours for the culture or 48 hours for the antimicrobial susceptibility testing.

In this study GeneXpert system was compared with traditional tests for MRSA detection in nasal swabs, blood-cultures and surgical wound swabs.

Materials and methods. Eighteen nasal swabs, 23 blood-cultures and 13 surgical wound swabs were tested. The samples were cultured on blood-agar and mannitol-salt agar. Identification of isolates was carried out with traditional tests (Gram staining, catalase, coagulase) and automatic Phoenix system. Methicillin-susceptibility was evaluated according to 2010 CLSI guidelines.

GeneXpert system was performed according to manufacturers instructions, by using the specific kits and methicillin-resistance was detected by amplification of the genic sequences *spa*, *SCC* e *mecA*.

Results. The results showed a 100% accordance between GeneXpert system and traditional tests for detection of methicillin-resistant staphylococci. In particular, among 18 nasal swabs, no MRSA was detected, while 1 blood-culture (4.3%) and 4 surgical wound swabs (30.7%) were positive for MRSA.

Conclusions. GeneXpert system allows a rapid detection of MRSA in clinical samples and shows the same sensitivity and specificity as traditional tests. Therefore, it represents a further effective diagnostic method for prevention and treatment of nosocomial infections due to methicillin-resistant staphylococci.

INTRODUZIONE

Le infezioni da *Staphylococcus aureus* meticillino-resistente (MRSA) hanno un'importanza epidemiologica globale, costituendo la maggioranza delle infezioni nosocomiali (2).

La meticillino-resistenza comporta notevoli problemi terapeutici e, oltre a determinare la resistenza a tutti i farmaci beta-lattamici, si associa spesso alla resistenza ad altre classi di farmaci (macrolidi, lincosamidi, tetracicline, aminoglicosidi), facendo sì che i chemioterapici efficaci verso tali batteri si limitino in pratica ai soli glicopeptidi, oxazolidoni e, di recentissima introduzione, tige-ciclina e daptomicina.

È documentato che i costi e la durata della degenza e la mortalità per infezioni da MRSA sono note-

volmente aumentati nell'ultimo decennio e che l'esito dell'infezione dipende strettamente dalla rapidità con cui viene instaurata la terapia antibiotica appropriata (5).

Varie sono le strategie disponibili per affrontare e contenere tale problematica.

La rapida identificazione di pazienti colonizzati da MRSA a livello nasale sembra essere utile al controllo della diffusione ospedaliera di questo microrganismo (4).

Da qui la necessità di adottare tecniche e sistemi in grado di fornire risultati certi in tempi utili, predisporre dei piani di prevenzione, anticipare quanto più possibile e ottimizzare l'approccio terapeutico a tali infezioni (7).

Attualmente sono disponibili numerosi sistemi

Corresponding author: Alessandra Sensini

Ospedale "Santa Maria della Misericordia"

Località Sant'Andrea delle Fratte - 06132, Perugia - Tel.: 075 5784284 - Fax: 075 5784286

E-mail: sensini@unipg.it

molecolari in grado di rilevare nei campioni biologici la presenza di *S. aureus* o stafilococchi coagulasi-negativi (CoNS) e la sensibilità (MS) o resistenza (MR) a meticillina, anche in tempi estremamente rapidi (9).

Il sistema GeneXpert® (Cepheid Europe, Vira-Solelch, Maurence-Scopont-France) è in grado di rilevare in campioni clinici con metodo genotipico la presenza di *S. aureus* o stafilococchi coagulasi-negativi meticillino-resistenti in un tempo stimato di circa un'ora, rispetto alle 24 ore necessarie per l'esame colturale e alle 48 ore necessarie per la valutazione fenotipica dell'antibiogramma (6).

Il test consente di automatizzare e integrare l'estrazione e l'amplificazione degli acidi nucleici con il rilevamento di sequenze bersaglio utilizzando la tecnica RT-PCR.

La meticillino-resistenza degli stafilococchi è determinata dall'acquisizione del gene *mecA*, che codifica per la proteina penicillin-binding-protein 2 α (PBP2 α).

In *S. aureus* il gene *mecA* è contenuto in un elemento genetico mobile, denominato *Staphylococcal Chromosomal Cassette (SCCmec)*, localizzato nel cromosoma batterico vicino alla sequenza di origine di replicazione.

Oltre al gene *mecA*, tale regione contiene i geni regolatori della sua espressione (*mecI*, *mecR1*), geni per enzimi di integrazione e di escissione sito-specifici (ricombinasi *ccrA*, *ccrB*) e sequenze di inserzione che mediano la resistenza ad altre classi di antibiotici. I ceppi MSSA presentano la cassetta *SCCmec*, priva del gene *mecA*, integrata in un sito specifico del cromosoma, localizzato all'estremità 3' di un *open reading frame* (ORF), *orfX*, la cui funzione è a tutt'oggi sconosciuta.

Il sistema GeneXpert® per l'identificazione di MRSA o MSSA in campioni biologici è basato sulla rilevazione mediante sonde fluorescenti di specifiche sequenze geniche:

- gene *spa*, che codifica per la proteina A ed indica la presenza di *S. aureus* nel campione biologico;
- gene *mecA*, che indica la presenza di ceppi di *S. aureus* o CoNS meticillino-resistenti;
- una sequenza della cassetta *SCCmec*, diversa da quella del gene *mecA*, che permette di associare la meticillino-resistenza rilevata alla

specie *S. aureus*.

In questo modo il sistema è in grado di rilevare MRSA o MSSA eventualmente presenti nel campione biologico insieme a CoNS meticillino-resistenti. Una quarta sonda, diretta verso una specifica regione genomica di *Bacillus globigi*, aggiunta al test, è utilizzata come controllo dell'intero processo di estrazione ed amplificazione.

In questo studio il sistema GeneXpert® è stato confrontato con le metodiche tradizionali per la rilevazione di MRSA in campioni clinici quali tamponi nasali, emocolture e tamponi da ferite chirurgiche.

MATERIALI E METODI

Campioni clinici

I campioni clinici (tamponi nasali, tamponi da ferita positivi per stafilococchi all'esame microscopico ed emocolture positive per stafilococchi in flaconi Bactec, Becton Dickinson, Milano) venivano seminati su agar-sangue di montone e agar sale-mannite (Becton Dickinson) e l'identificazione degli isolati stafilococcici era eseguita con metodi tradizionali (colorazione di Gram, test della catalasi, coagulasi libera e coagulasi legata alla cellula) e sistema automatico Phoenix (Becton Dickinson).

La sensibilità alla meticillina degli isolati batterici veniva valutata secondo i criteri CLSI 2010 (3) con il test per diffusione con cefoxitina, la rilevazione di PBP2 α costitutiva e inducibile mediante test al lattice (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia), e i valori di MIC di oxacillina e cefoxitina (pannello PMIC/ID53 Phoenix, Becton Dickinson).

GeneXpert

I campioni biologici venivano processati mediante l'utilizzazione dei kit specifici "Xpert *Stafilococcus aureus* meticillina resistente e sensibile da tampone nasale", "Xpert *Stafilococcus aureus* meticillina resistente da ferita", "Xpert *Stafilococcus aureus* meticillina resistente da emocoltura" secondo le istruzioni della Ditta produttrice (Cepheid Europe).

La positività per MRSA, MSSA o per stafilococchi coagulasi-negativi meticillino-resistenti veniva rilevata dal software in base alla amplificazione delle sequenze geniche *spa*, *SCC* e *mecA*, secondo il seguente schema:

Isolato	<i>spa</i>	<i>SCC</i>	<i>mecA</i>
MRSA	+	+	+
MSSA	+	+	-
MR-CoNS	-	-	+
MSSA + MR-CoNS	+	-	+

I campioni contenenti CoNS meticillino-sensibili risultano negativi per tutte e tre le sequenze.

RISULTATI

Tamponi nasali

Dei 18 tamponi nasali analizzati, nessuno era positivo per MRSA, mentre 7 erano positivi per MSSA (38.8%).

Undici tamponi sono risultati negativi per *S. aureus* (MRSA o MSSA), ma positivi per CoNS (2 meticillino-resistenti, 9 meticillino-sensibili) con il sistema real-time (Tabella 1). L'esame colturale ha confermato i risultati del *test* molecolare, la suscettibilità a meticillina dei 7 isolati *S. aureus* (MIC oxacillina = 0.5 µg/ml per 4 isolati, ≤0.25 µg/ml per 3 isolati; MIC cefoxitina = 4 µg/ml per 3 isolati e ≤0.25 µg/ml per 4 isolati) e degli 11 isolati coagulasi negativi (dati non mostrati).

Pertanto, nessuna discordanza è stata riscontrata tra il sistema GeneXpert e la metodica tradizionale nella rilevazione di MRSA da tamponi nasali.

Tamponi da ferita

Dei 13 tamponi da ferita analizzati dopo che l'esame microscopico di Gram era risultato positivo per cocci Gram positivi ad ammassi, 4 sono risultati positivi per MRSA (30.7%), 2 per MSSA (15.3%), 2 per MR-CoNS e 5 per MS-CoNS.

Nessuna discordanza è stata riscontrata tra il sistema GeneXpert e la metodica tradizionale (Tabella 2).

La valutazione della meticillino-resistenza sulla base dei valori di MIC di oxacillina e cefoxitina

per *S. aureus* e di MIC di oxacillina e diametro di inibizione di cefoxitina per CoNS hanno confermato i dati ottenuti con GeneXpert (Tabella 3).

Emocolture

Delle 23 emocolture positive per stafilococchi all'esame microscopico dopo colorazione di Gram, una è risultata positiva per MRSA (4.3%), 10 per MSSA (43.4%), 4 per MR-CoNS (17.3%) e 8 per MS-CoNS (34.7%).

Anche in quest'ultimo caso non è stata riscontrata alcuna discordanza tra il sistema GeneXpert e le metodiche di riferimento (Tabelle 4 e 5).

CONCLUSIONI

Il sistema GeneXpert permette una rapida rilevazione di MRSA e MSSA in campioni clinici.

I risultati ottenuti, pur necessitando di essere confermati con un numero più elevato di campioni biologici, suggeriscono una ottima correlazione con le metodiche tradizionali di riferimento.

Pertanto, tale sistema molecolare può rappresentare un efficace mezzo diagnostico di laboratorio per la prevenzione e il trattamento delle infezioni da stafilococchi meticillino-resistenti.

L'immediata conseguenza di tale approccio potrebbe essere un significativo contenimento della spesa sanitaria per terapie antibiotiche non necessarie o non efficaci e una riduzione della mortalità per tali infezioni come dimostrato (1, 8).

Tabella 1. Confronto tra sistema GeneXpert e i metodi fenotipici di riferimento per il rilevamento di MRSA in tamponi nasali.

Metodi fenotipici	GeneXpert			
	Positivo per <i>S. aureus</i>		Negativo per <i>S. aureus</i>	
	MRSA	MSSA	<i>mecA</i> +	<i>mecA</i> -
MRSA	0	0	0	0
MSSA	0	7	0	0
MR-CoNS	0	0	2	0
MS-CoNS	0	0	0	9
Totale	0	7	2	9

Tabella 2. Confronto tra sistema GeneXpert e i metodi fenotipici di riferimento per il rilevamento di MRSA in tamponi da ferita chirurgica.

Metodi fenotipici	GeneXpert			
	MRSA	MSSA	MR-CoNS	Negativo per <i>S. aureus</i> o gene <i>mecA</i>
MRSA	4	0	0	0
MSSA	0	2	0	0
MR-CoNS	0	0	2	0
MS-CoNS	0	0	0	5
Totale	4	2	2	5

Tabella 3. Identificazione biochimica e valutazione della suscettibilità a meticillina degli isolati stafilococchi da ferita chirurgica mediante MIC di oxacillina e di cefoxitina per *S. aureus* e MIC di oxacillina e diametro di inibizione di oxacillina per gli stafilococchi coagulasi negativi

Isolato	Specie	Oxacillina	Cefoxitina	Cefoxitina
		MIC ($\mu\text{g/ml}$)/R S ^a	MIC ($\mu\text{g/ml}$)/R S	diametro di inibizione (mm)/R S
MRSA				
1	<i>S. aureus</i>	>2 / R	>8 / R	-
2	<i>S. aureus</i>	>2 / R	>8 / R	-
3	<i>S. aureus</i>	>2 / R	>8 / R	-
4	<i>S. aureus</i>	>2 / R	>8 / R	-
MSSA				
1	<i>S. aureus</i>	= 0.5 / S	4 / S	-
2	<i>S. aureus</i>	= 0.5 / S	4 / S	-
MR-CoNS				
1	<i>S. capitis</i>	> 2 / R	-	14 / R
2	<i>S. haemolyticus</i>	> 2 / R	-	10 / R
MS-CoNS				
1	<i>S. epidermidis</i>	\leq 0.25 / S	-	30 / S
2	<i>S. capitis</i>	\leq 0.25 / S	-	32 / S
3	<i>S. epidermidis</i>	\leq 0.25 / S	-	40 / S
4	<i>S. haemolyticus</i>	\leq 0.25 / S	-	30 / S
5	<i>S. hominis</i>	\leq 0.25 / S	-	28 / S

a) R, resistente; S, sensibile. L'interpretazione dell'antibiogramma è stata eseguita in base ai criteri CLSI 2010 (3).

Tabella 4. Confronto tra sistema GeneXpert e i metodi fenotipici di riferimento per il rilevamento di MRSA in emocolture positive per stafilococchi all'esame microscopico dopo colorazione di Gram

Metodi fenotipici	GeneXpert			
	MRSA	MSSA	MR-CoNS	Negativo per <i>S. aureus</i> e gene <i>mecA</i>
MRSA	1	0	0	0
MSSA	0	10	0	0
MR-CoNS	0	0	4	0
MS-CoNS	0	0	0	8
Totale	1	10	4	8

Tabella 5. Identificazione biochimica e valutazione della suscettibilità a meticillina degli isolati stafilococchi da emocoltura mediante MIC di oxacillina e di cefoxitina per *S. aureus* e MIC di oxacillina e diametro di inibizione di oxacillina per gli stafilococchi coagulasi negativi

Isolato	Specie	Oxacillina MIC (µg/ml)/R S ^a	Cefoxitina MIC (µg/ml)/R S	Cefoxitina diametro di inibizione (mm)/R S
MRSA				
1	<i>S. aureus</i>	>2 / R	>8 / R	-
MSSA				
1	<i>S. aureus</i>	= 0.5 / S	4 / S	-
2	<i>S. aureus</i>	= 0.5 / S	4 / S	-
3	<i>S. aureus</i>	= 0.5 / S	2 / S	-
4	<i>S. aureus</i>	≤ 0.25 / S	2 / S	-
5	<i>S. aureus</i>	= 0.5 / S	4 / S	-
6	<i>S. aureus</i>	= 0.5 / S	4 / S	-
7	<i>S. aureus</i>	≤ 0.25 / S	2 / S	-
8	<i>S. aureus</i>	= 0.5 / S	4 / S	-
9	<i>S. aureus</i>	≤ 0.25 / S	2 / S	-
10	<i>S. aureus</i>	≤ 0.25 / S	2 / S	-
MR-CoNS				
1	<i>S. epidermidis</i>	0.5 / R	-	14 / R
2	<i>S. epidermidis</i>	> 2 / R	-	10 / R
3	<i>S. haemolyticus</i>	> 2 / R	-	10 / R
4	<i>S. haemolyticus</i>	> 2 / R	-	12 / R
MS-CoNS				
1	<i>S. epidermidis</i>	≤ 0.25 / S	-	30 / S
2	<i>S. capitis</i>	≤ 0.25 / S	-	32 / S
3	<i>S. epidermidis</i>	≤ 0.25 / S	-	40 / S
4	<i>S. haemolyticus</i>	≤ 0.25 / S	-	30 / S
5	<i>S. hominis</i>	≤ 0.25 / S	-	28 / S
6	<i>S. epidermidis</i>	≤ 0.25 / S	-	32 / S
7	CoNS ^e	≤ 0.25 / S	-	34 / S
8	CoNS	≤ 0.25 / S	-	28 / S

R, resistente; S, sensibile. L'interpretazione dell'antibiogramma è stata eseguita in base ai criteri CLSI 2010 (3). CoNS, stafilococco coagulasi-negativo non identificato a livello di specie.

BIBLIOGRAFIA

- Brown J, Paladino JA. Impact of rapid methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* polymerase chain reaction testing on mortality and cost effectiveness in hospitalized patients with bacteraemia: a decision model. *Pharmacoeconomics*. 2010; 28: 567-55.
- Chambers HF, Deleo FR. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. *Nat Rev Microbiol* 2009; 7: 629-41.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility testing; Twentieth Information Supplement. M100-S20. 2010. *Clinical and Laboratory Standards Institute; Wayne. PA.*
- Jerningam JA, Titus MG, Groschel DH, Gethell-White S, Bergeron BM. Effectiveness of contact isolation during a hospital outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Am J Epidemiol* 1996; 143: 496-504.
- Kumar A, Robert D, Wood KE. Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock. *Critical Care Med* 2006; 34: 1589-96.
- Parta M, Goebel M, Matloobi M, Stager C, Musher DM Identification of methicillin-resistant or methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* in blood cultures and wound swabs by GeneXpert. *J Clin Microbiol* 2009; 47: 1609-10.
- Rubinovitch B, Pittet D. Screening for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the endemic hospital: what have we learned? *J Hosp Infect* 2001; 47: 9-18.
- Tacconelli E. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: source control and surveillance organization. *Clin Microbiol Infect* 2009; 15: 31-8.
- Wasseberg MW, Kluytmans JA, Box AT, et al. Rapid screening of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using PCR and chromogenic agar: a prospective study to evaluate costs and effects. *Clin Microbiol Infect* 2010; 16: 1754-61.