

# IDENTIFICAZIONE BIOMOLECOLARE DI CEPPI DI STAPHYLOCOCCUS AUREUS METICILLINO-RESISTENTI (MRSA) ISOLATI DA MATRICI CARNEE E DA AMBIENTI DI PRODUZIONE

## **BIOMOLECULAR IDENTIFICATION OF METHICILLIN-RESISTANT STRAINS OF STAPHYLOCOCCUS AUREUS (MRSA) ISOLATED FROM MEAT AND MEAT PROCESSING ENVIRONMENTS**

D'Orio V. <sup>1</sup>, Festino A. R. <sup>1</sup>, Costanzo C. <sup>1</sup>, Di Ciccio P. <sup>1</sup>, Colavita G. <sup>2</sup>, Vergara A. <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento di Scienze degli Alimenti, Università degli Studi di Teramo

<sup>2</sup> Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agro-Alimentari Ambientali e Microbiologiche, Università del Molise, Campobasso

### **SUMMARY**

371 samples from meat and meat-environments were collected and examined for the detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). The structural gene for penicillin-binding protein 2a (*mecA* gene), was amplified by PCR and detected by agarose gel electrophoresis. 96 samples (25.8%), contained *S. aureus* and 2 of them (2.08%) were *mecA* positive. Further assays are necessary to evaluate the spread of MRSA in food and food-environments.

### **Key words**

*Staphylococcus aureus*, Methicillin resistance, MRSA, *mecA*.

### **INTRODUZIONE**

*Staphylococcus aureus* è un microrganismo patogeno tra quelli più frequentemente isolati nelle infezioni ospedaliere, in grado di provocare setticemie e infezioni a carico di cute, apparato respiratorio e tessuti molli (12). *S. aureus* rappresenta, inoltre, una delle principali cause di tossinfezione alimentare in seguito ad ingestione di alimenti contenenti enterotossine preformate (SE) (8).

Le maestranze rappresentano il principale serbatoio di *S. aureus* albergando il microrganismo a livello di cute, fornice congiuntivale e mucose orofaringee (6). Gli alimenti più frequentemente coinvolti nei fenomeni tossinfettivi sono, quindi, quelli sottoposti a notevoli manipolazioni.

Una importante ed attuale problematica sanitaria legata a questo microrganismo è la crescente presenza di ceppi resistenti a diversi antibiotici e in

particolare alla meticillina.

I ceppi di *S. aureus* meticillino-resistenti (MRSA) sono frequentemente isolati nelle infezioni ospedaliere rappresentando un rischio per i soggetti ospedalizzati e immunocompromessi (16). La prevalenza dei ceppi MRSA in Europa è in crescita: dallo 0,1 – 1,5% per Danimarca, Svizzera, Olanda, al 30,3 – 34,4% per Spagna, Francia, Italia (16).

Il meccanismo attraverso il quale i ceppi di *S. aureus* diventano meticillino-resistenti è l'acquisizione del gene *mecA* che codifica una proteina di membrana denominata *Penicillin binding protein* (PBP 2a), caratterizzata da una bassa affinità per la maggior parte dei  $\beta$ -lattamici (2, 3, 13).

Gli alimenti rappresentano un importante veicolo per la diffusione di ceppi patogeni antibiotico-resistenti; diverse matrici alimentari quali carni avicole, suine, latte e formaggi sono, infatti, risultate contaminate da ceppi di MRSA (9, 14, 15).

Scopo del presente lavoro è stata la ricerca e l'identificazione di ceppi di MRSA isolati da matrici carnee e ambienti di produzione, mediante tecniche di biologia molecolare.

## MATERIALI E METODI

Sono stati prelevati in diverse industrie alimentari del Centro Italia dedite alla lavorazione e trasformazione di carni (bovine, suine ed avicole), campioni di materia prima, semilavorati, prodotti finiti e campioni ambientali. Nello specifico sono stati prelevati 371 campioni di cui 158 provenienti da matrici carnee e 213 da ambienti di produzione (Tab. 1). I prelievi ambientali sono stati effettuati con la tecnica dello "swabbing".

La ricerca di *S. aureus* è stata condotta secondo la metodica UNI EN ISO 6888-2, mentre l'identificazione biochimica è stata effettuata mediante il sistema automatizzato VITEK (bioMérieux). È stata, contemporaneamente, messa a punto ed eseguita una PCR per l'identificazione del gene *mecA* modificando i protocolli di Geha *et al.*, 1994 e Araj *et al.*, 1998 (1, 5). Per ogni ceppo di *S. aureus* sono state allestite colture overnight in Tryptone Soya Broth (TSB) (Oxoid) successivamente centrifugate e trattate con 2 l di lisostafina (10 mg/ml) (Sigma-Aldrich) per 1 ora a 37°C. Il DNA genomico è stato estratto mediante il kit "High Pure PCR Template Preparation Kit" (Roche) seguendo le istruzioni fornite dal produttore.

La coppia di primer è stata sintetizzata da Eurogentec (Seraing, Belgio). Il primer *mecA1* (5'-GTA GAA ATG ACT GAA CGT CCG ATA A) è complementare ai nucleotidi da 318 a 342. Il primer *mecA2* (5'-CCA ATT CCA CAT TGT TTC GGT CTA A) è complementare ai nucleotidi da 603 a 627. Come controlli sono stati utilizzati un ceppo di *S. aureus* meticillino-sensibile (MSSA) (ATCC 29213) e un ceppo MRSA (ATCC 33591).

Tutte le amplificazioni sono state eseguite in un volume di 50µl contenente buffer 1X (10mM Tris/HCl pH 8,3, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl), 200µM dNTP mix, 1µM ciascun primer, 1,25U di Taq polimerasi e 5µl di DNA.

L'amplificazione del DNA è stata effettuata mediante termociclatore (Eppendorf, Germania) utilizzando il seguente ciclo di reazione: denaturazione iniziale a 94°C per 4 minuti seguita da 30 cicli di amplificazione (denaturazione a 94°C per 45 secondi, annealing a 50°C per 45 secondi, extension a 72°C per 60 secondi) seguiti da un allungamento finale a 72°C per 2 minuti.

I prodotti di amplificazione sono stati separati mediante elettroforesi in gel di agarosio all'1,5% e visualizzati mediante transilluminatore UV (Bio-Rad) previa colorazione con bromuro di etidio (Tab. 1).

## RISULTATI

Dai 371 campioni complessivamente analizzati, sono stati isolati ed identificati 96 ceppi di *S. aureus* (25,8%) così distinti: 45 (46,8%) di origine alimentare e 51 (53,1%) di origine ambientale. Tutti sono stati saggiati per la meticillino-resistenza. Due ceppi (2,08%) provenienti da cotoletta di pollo (TE-CP 283) e salame (TE-SA 135) sono risultati *mecA* positivi evidenziando un prodotto di amplificazione delle dimensioni attese (391pb) (Fig. 1). Nessuno dei ceppi ambientali è risultato positivo.

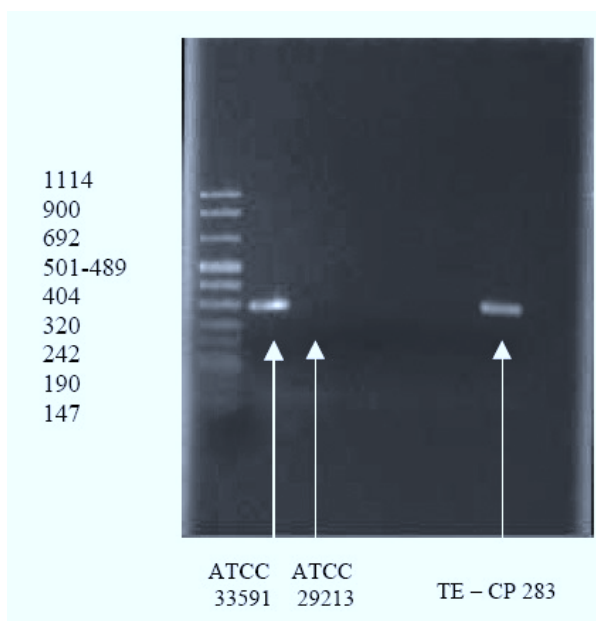
## CONCLUSIONI

Infezioni sostenute da ceppi di *S. aureus* meticillino-resistenti sono riportate in letteratura da oltre 30 anni. Inizialmente questi episodi rappresentavano un problema nosocomiale (*hospital-acquired*, HA) colpendo categorie considerate ad elevato rischio. Più recentemente, invece, sono state de-

Tab. 1. Elenco dei ceppi di *S. aureus* e di MRSA

MATRICE	CAMPIONAMENTI	S. AUREUS ISOLATI	MRSA
CARNE AVICOLA	34	23 (67,64 %)	1
CARNE BOVINA	52	2 (3,84%)	-
CARNE SUINA	72	20 (27,77%)	1
SUPERFICI	213	51 (23,94%)	-
<b>TOTALE</b>	<b>371</b>	<b>96 (25,87%)</b>	<b>2 (2,08%)</b>

Fig. 1. Prodotti dell'amplificazione del gene *mecA* comparati con il marker di riferimento



scritte con crescente frequenza infezioni acquisite (*community-acquired*, CA) in soggetti non ospedalizzati né esposti a particolari fattori di rischio (3). L'incremento della diffusione di questi ceppi, l'eterogeneità dei soggetti colpiti e le difficoltà terapeutiche emerse hanno accresciuto, nell'ultimo decennio, l'interesse per *S. aureus* (14). Un'ulteriore ed attuale problematica è quella relativa all'isolamento di ceppi multiresistenti, in particolare di MRSA, da matrici alimentari (11). Il primo focolaio di infezione

di origine alimentare causato da MRSA, segnalato nel 1995, si è caratterizzato, oltre che per la nuova fonte del patogeno, anche, per l'elevato tasso di mortalità. *S. aureus* è da sempre considerato tra le più frequenti cause di tossinfezione alimentare; i ceppi MRSA veicolati da alimenti rappresentano un ulteriore fattore di rischio per la salute pubblica (10). Comunemente la sensibilità alla meticillina viene valutata attraverso l'impiego di metodiche fenotipiche la cui attendibilità e ripetibilità variano al variare dell'espressione della meticillino-resistenza. Le tecniche di biologia molecolare per la determinazione del gene *mecA* permettono, al contrario, di identificare correttamente tutti i ceppi in grado di esprimere il fenotipo di resistenza (2, 3).

Il risultato ottenuto dimostra, in accordo con altri Autori, come solo una piccola percentuale di ceppi MRSA sia presente negli alimenti di origine animale (14, 15). Il diffondersi della meticillino-resistenza tra i vari ceppi di *S. aureus* è tuttavia riconosciuta una emergenza a livello mondiale, soprattutto in ambito ospedaliero, dove si assiste contemporaneamente al fenomeno di multiresistenza verso varie molecole. La raccolta di dati epidemiologici rappresenta un momento fondamentale nel contesto della valutazione del rischio; studi approfonditi sono pertanto necessari per meglio comprendere il ruolo rivestito dagli alimenti come vettori di ceppi MRSA, anche alla luce del fatto che i mangimi medicati a scopo terapeutico o come promotori di crescita, somministrati agli animali da reddito, possono determinare un incremento dei ceppi antibiotico-resistenti negli alimenti (4).

## BIBLIOGRAFIA

- 1) Araj G.F., Talhouk R.S., Simaan C.J., Maasad M.J. (1999). Discrepancies between *mecA* PCR and conventional tests used for detection of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Antimicrobial Agents* 11, 47-52.
- 2) Baddour M.M., AbuElkheir M.M., Fatani A.J. (2007). Comparison of *mecA* polymerase chain reaction with phenotypic methods for the detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Curr. Microbiol.* 55, 473-479.
- 3) Chambers H.F. (1997). Methicillin resistance in Staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clinical Microbiology Reviews*, 781-791.
- 4) EFSA (2004). The community summary report trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and antimicrobial resistance in the European Union in 2004. <http://www.efsa.europa.eu>.
- 5) Geha D.J., Uhl J.R., Gustafarro C.A. Persing D.H. (1994). Multiplex PCR for identification of Methicillin-Resistant Staphylococci in the clinical laboratory. *Journal of Clinical Microbiology* 7, 1768-1772.
- 6) Giaccone V., Colavita G., Ianieri A., Vergara A., Ferrato P., Ricci G. (2000). Ricerca di *Staphylococcus aureus* da fornace congiuntivale di addetti alla lavorazione di prodotti alimentari: nota preliminare. Atti AIVI, 157-161.
- 7) Jones T. F., Kellum M.E., Porter S.S., Bell M., Schaffner W. (2002). An outbreak of community-acquired foodborne illness caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Emerging Infectious Disease* 8, 82-84.
- 8) Kerouanton A., Hennekinne J.A., Letertre C., Petit L., Chesneau O., Brisabois A., De Buyser M.L. (2007). Characterization of *Staphylococcus aureus* strains associated with food poisoning outbreaks in France. *International Journal of Food Microbiology* 115, 369-375.
- 9) Kitai S., Shimizu A., Kawano J., Sato E., Nakano C., Kitagawa H., Fujio K., Matsumura K., Yasuda R., Inamoto T. (2004). Prevalence and characterization of *Staphylococcus aureus* and enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in retail raw chicken meat throughout Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 67(3):269-274, 2005.
- 10) Kluytmans J., Van Leeuwen W., Goessens W., Hollins R., Messer S., Herwaldt L., Bruinig H., Heck M., Rost J., Van Leeuwen N., Van Belkum A., Verbrugh H. (1995). Food-Initiated outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* analyzed by pheno-and genotyping. *J. Clin. Microbiol.* 5,1121-1128.
- 11) Lee J.H. (2003). Methicillin (Oxacillin) – resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from major food animals and their potential transmission to humans. *Applied and Environmental Microbiology* 69, (11) 6489-6494.
- 12) Lowy F.D. (1998). *Staphylococcus aureus* infection. *N. Engl. J. Med.*, 339, 520-532.
- 13) Murakami K., Minamide W., Wada K., Nakamura E., Teraoka H., Watanabe S. (1991). Identification of Methicillin-Resistant Strain of Staphylococci by Polymerase Chain Reaction. *Journal of Clinical Microbiology* 10, 2240-2244.
- 14) Normanno G., Corrente M., La Salandra G., Dambrosio A., Quaglia N.C., Parisi A., Greco G., Bellacicco A.L., Virgilio S., Celano G.V. (2007). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in foods of animal origin product in Italy. *International Journal of Food Microbiology* 117, 219-222.
- 15) Normanno G., Dambrosio A., Quaglia N.C., Corrente M., Lo russo V., Santagada G., Lillo T., Merico A., La Salandra G. (2007). Antibiotico resistenza in stipiti di *Staphylococcus aureus* isolati da alimenti di origine animale: problematiche di Sanità Pubblica. Atti AIVI, 297-302.
- 16) Pesavento G., Ducci B., Comodo N., Lo Nostro A. (2005). Antimicrobial resistance profile of *Staphylococcus aureus* isolated from raw meat: A research for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Food Control* 18, 196-200.