

FULL PAPERS

Typing of emm77 *Streptococcus pyogenes* strains isolated from different clinical samples

Claudio Palmieri¹, Maria Stella Princivalli¹, Lucilla Baldassarri², Roberta Creti², Pietro Emanuele Varaldo¹, Bruna Facinelli¹

¹Istituto di Microbiologia e Scienze Biomediche, Università Politecnica delle Marche, Ancona;

²Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie ed Immunomediate, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Key words: *Streptococcus pyogenes*, emm77, ST63/369, erm(A) tet(O), MLST

Tipizzazione di ceppi di *Streptococcus pyogenes* emm77 isolati da differenti campioni clinici

SUMMARY

Population structure analysis of emm77 *Streptococcus pyogenes* isolates demonstrated that the Clonal Complex ST63/369, previously reported in Italian pharyngeal strains, can also be found in non-pharyngeal strains. The success of ST63/369 may be due to the association of specific resistance [iMLS-B/erm(A); tet(O)] and virulence [internalization-gene prtF1] traits.

Received May 6, 2008

Accepted July 24, 2008

INTRODUZIONE

Da uno studio su ceppi di *Streptococcus pyogenes* isolati in Italia nel biennio 1997-98 da casi di faringo-tonsillite acuta in età pediatrica (13), è emersa una associazione inaspettata tra eritromicina-resistenza e capacità di invadere cellule epiteliali respiratorie (3). *S. pyogenes* è un patogeno intracellulare, in grado di invadere cellule epiteliali umane (1) e l'invasione è mediata da una sottoclasse di adesine che prendono il nome di invasive. Tra queste, un ruolo cruciale è giocato da F1, una proteina *fibronectin (fn)-binding*, codificata dal gene *prtF1* (7). La regione ripetuta RD2 di *prtF1*, fondamentale per il legame alla *fn*, può essere utilizzata nella tipizzazione molecolare dei ceppi (11). Il confronto dei risultati di RD2-typing, emm-typing e PFGE con il genotipo/fenotipo di resistenza consentiva di identificare numerosi cloni resistenti ed invasivi in circolazione in Italia (11). In particolare, tre cloni rappresentavano il 40% di tutti i ceppi studiati: (i) iMLS-B/erm(A), emm77; (ii) M/mef(A), emm4; e (iii) iMLS-A/erm(B), emm89.

In un analogo studio di popolazione (NORM 2002), condotto su ceppi resistenti ai macrolidi isolati in Norvegia da differenti campioni clinici nel 1998-2002 e tipizzati mediante emm-typing e multilocus sequence typing (MLST) (5), è emerso che la diffusione di *S. pyogenes* in Norvegia era ugualmente policlonale e che quattro cloni com-

prendevano il 75% dei ceppi analizzati: (i) erm(A), emm77, sequence type (ST) 63/369; (ii) erm(A), emm22, ST46/368; (iii) mef(O), emmstNS1033, ST205; e (iv) mef(A), emm4, ST39. Nel 2006 uno studio comparativo, condotto su ceppi isolati in Italia da faringe e ceppi isolati da differenti campioni clinici in Norvegia, ha messo in evidenza che i ceppi erm(A) emm77 isolati in Italia e Norvegia appartengono allo stesso clone (ST63/369) (9).

In questo studio, ceppi emm77, isolati in Italia nel 2003-2005 da differenti campioni clinici, sono stati sottoposti a tipizzazione fenotipica e genotipica per verificare la persistenza sul territorio italiano di ST63/369.

MATERIALE E METODI

Ceppi. Lo studio comprendeva 10 ceppi di *S. pyogenes* emm77 di cui 6 isolati da faringe, 2 da sangue, 1 da ferita, ed 1 da un caso di *toxic shock syndrome* (TSS) (tabella 1). SP1900 (ST63/369, erm(A), emm77) (9) veniva utilizzato come controllo.

Determinazione fenotipo e genotipo di resistenza. La sensibilità a macrolidi e tetracicline è stata determinata mediante metodo di Kirby Bauer. La determinazione del fenotipo di resistenza ai macrolidi è stata eseguita mediante tecnica del triplo dischetto come descritto da Giovanetti et al. (4). La presenza di geni erm, mef, e tet è stata sag-

Corresponding author: Claudio Palmieri

Istituto di Microbiologia e Scienze Biomediche - Università Politecnica delle Marche

Via Tronto 10/A, 60100 Ancona - Italia

Tel: + 39 071 220 6292 - Fax: + 39 071 220 6293 - E-mail: unopunto26@virgilio.it

giata mediante PCR utilizzando *primers* specifici, come precedentemente descritto (8, 9).

Tipizzazione molecolare. I ceppi sono stati tipizzati mediante studio della regione *RD2* di *prtF1* (*RD2-typing*), PFGE dopo macrorestrizione del DNA genomico con *SmaI* ed MLST. *RD2 typing* è stata condotta mediante PCR e digestione degli amplificati con *HaeIII* come precedentemente descritto (11): il pattern di restrizione definiva il tipo *RD2*. La MLST è stata effettuata utilizzando 7 *loci house keeping*: *glucose kinase (gki)*, *glutamine transporter protein (gtr)*, *glutamate racemase (murI)*, *DNA mismatch repair protein (mutS)*, *transketolase (recP)*, *xanthine phosphoribosyl transferase (xpt)*, ed *acetyl coenzyme A acetyltransferase (yqiL)* come descritto da Enright et al. (2); il numero allelico di ciascun *locus* ed il ST sono stati ottenuti dal sito web <http://www.mlst.net>.

RISULTATI

Fenotipo e genotipo di resistenza. Ad eccezione del ceppo SP5647, resistente a tetracicline *tet(M)* e sensibile a macrolidi, rimanenti ceppi saggiati erano resistenti sia a tetraciclina [*tet(O)*] che a macrolidi [*erm(A)*, fenotipo inducibile (iMLS-B)] (tabella 1).

RD2 typing. In tutti i ceppi, mediante PCR si ottenevano un amplificato di 349 bp consistente con la presenza di due ripetizioni complete da 111 bp ed una incompleta da 97 bp. L'analisi di restrizione con *HaeIII* metteva in evidenza 2 tipi *RD2* (tabella 1): tipo d, presente in 9 ceppi (compreso il ceppo di controllo SP1900); e tipo x presente nel ceppo SP5647.

PFGE ed MLST. La PFGE evidenziava 4 pulsotipi (figura I), che differivano dal pulsotipo del ceppo SP1900 per 2 bande (pulsotipo A, SP4156, SP4170, SP5984, SP6040, SP6064, SP6085), per 3 bande (pulsotipo C, SP4638,

Tabella I. Caratteristiche dei ceppi di *S. pyogenes* emm77: fenotipo/genotipo di resistenza, *RD2*, PFGE e Sequence Type (ST)

| Ceppo | Origine | Fenotipo/Genotipo di resistenza ai macrolidi | Genotipo di resistenza alla tetraciclina | <i>RD2</i> type* | PFGE type | Sequence type |
|--------|---------|--|--|------------------|-----------|---------------|
| SP4156 | Faringe | iMLS-B/ <i>erm(A)</i> | <i>tet(O)</i> | d | A | ST63/369 |
| SP4170 | Faringe | iMLS-B/ <i>erm(A)</i> | <i>tet(O)</i> | d | A | ST63/369 |
| SP4638 | Faringe | iMLS-B/ <i>erm(A)</i> | <i>tet(O)</i> | d | C | ST63/369 |
| SP4678 | Faringe | iMLS-B/ <i>erm(A)</i> | <i>tet(O)</i> | d | C | ST63/369 |
| SP5984 | Ferita | iMLS-B/ <i>erm(A)</i> | <i>tet(O)</i> | d | A | ST63/369 |
| SP5110 | TSS | iMLS-B/ <i>erm(A)</i> | <i>tet(O)</i> | d | D | ST63/369 |
| SP5647 | Sangue | Sensibile | <i>tet(M)</i> | x | E | ST399 |
| SP6040 | Faringe | iMLS-B/ <i>erm(A)</i> | <i>tet(O)</i> | d | A | ST63/369 |
| SP6064 | Faringe | iMLS-B/ <i>erm(A)</i> | <i>tet(O)</i> | d | A | ST63/369 |
| SP6085 | Sangue | iMLS-B/ <i>erm(A)</i> | <i>tet(O)</i> | d | A | ST63/369 |
| SP1900 | Faringe | iMLS-B/ <i>erm(A)</i> | <i>tet(O)</i> | d | B | ST63/369 |

*: d, tipo *RD2* descritto da Spinaci et al. (11); x, nuovo

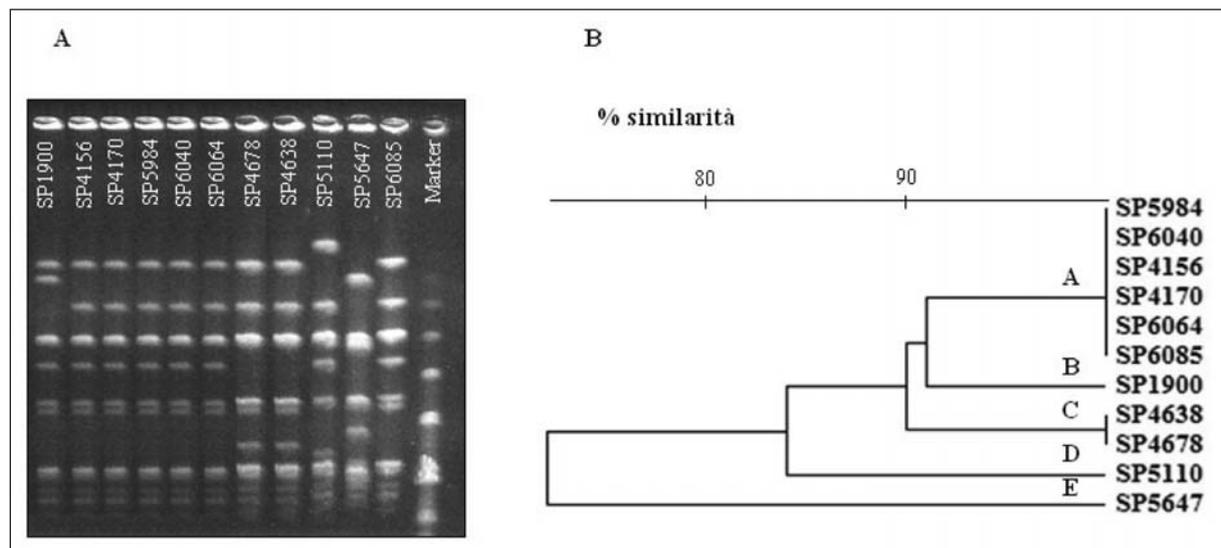


Figura I. Tipi PFGE (A) e dendrogramma (B) dei ceppi di *S. pyogenes* studiati. M, marker (Low Range PFG marker, New England Biolabs, Beverly, Mass)

SP4678), per 5 bande (pulsotipo D, SP5110; pulsotipo E, SP5647). I risultati della MLST dimostravano che il ceppo SP5647 apparteneva a ST399 mentre i restanti ceppi appartenevano al complesso clonale ST63/369.

DISCUSSIONE

In base ai criteri di interpretazione dei profili di PFGE descritti da Tenover *et al.* (12), otto ceppi, tutti *erm(A) tet(O)* e provenienti da differenti campioni clinici (faringe, ferita, sangue), risultavano strettamente correlati a SP1900, isolato in origine da faringe; la stretta correlazione veniva confermata dai risultati della MLST, che dimostravano l'appartenenza degli isolati a ST63/369. Il ceppo *erm(A) tet(O)*, isolato da un caso di TSS, veniva assegnato al complesso clonale ST63/369 ma tramite PFGE risultava solo possibilmente correlato al controllo.

Il ceppo SP5647, isolato da sangue, è risultato essere l'unico ceppo sensibile a macrolidi. La PFGE lo indicava come possibilmente correlato a SP1900 ma la MLST lo assegnava ad un ST differente (ST399), descritto precedentemente in Thailandia (10). *RD2-typing* confermava i risultati della MLST, in quanto tutti gli isolati ST63/369 presentavano lo stesso tipo, mentre il ceppo ST399 presentava un tipo *RD2* mai descritto in precedenza.

I risultati di questo studio evidenziano la persistenza nel tempo di ST63/369 tra i ceppi faringei in circolazione in Italia, documentano la sua presenza anche tra ceppi non faringei e suggeriscono che eventi genetici recenti possano avere modificato il profilo di restrizione del ceppo da TSS.

Il successo di ST63/369 può derivare dal fatto che i ceppi resistenti ed invasivi presentano evidenti vantaggi selettivi: possono infatti sfuggire alla penicillina ed agli altri β -lattamici grazie alla localizzazione intracellulare ed ai macrolidi grazie alla resistenza.

Inoltre, la presenza di ST63/369 tra ceppi di *S. pyogenes*, isolati sia nel corso di infezioni non invasive che di infezioni invasive, può essere spiegata dal particolare tipo *emm* (*emm77*), che non mostra preferenza per un particolare sito di infezione (6).

BIBLIOGRAFIA

1. Cleary PP, Cue D. High frequency invasion of mammalian cells by beta hemolytic streptococci. *Subcell Biochem*, 2000; 33: 137-66.
2. Enright MC, Spratt BG, Kalia A, Cross JH, Bessen DE. Multilocus sequence typing of *Streptococcus pyogenes* and the relationships between *emm* type and clone. *Infect Immun*, 2001; 69: 2416-27.
3. Facinelli B, Spinaci C, Magi G, Giovanetti E, Varaldo PE. Association between erythromycin resistance and ability to enter human respiratory cells in group A streptococci. *Lancet*, 2001; 358: 30-3.
4. Giovanetti E, Montanari MP, Mingoia M, Varaldo PE. Phenotypes and genotypes of erythromycin-resistant *Streptococcus pyogenes* strains in Italy and heterogeneity of inducibly resistant strains. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 1935-40.
5. Littauer P, Sangvik M, Caugant DA, Høiby EA, Simonsen GS, Sundsfjord A. Macrolide-resistant *Streptococcus pyogenes* in Norway: population structure and resistance determinants. *Antimicrob Agents Chemother*, 2006; 50: 1896-9.
6. McGregor KF, Spratt BG, Kalia A, et al. Multilocus sequence typing of *Streptococcus pyogenes* representing most known *emm* types and distinctions among subpopulation genetic structures. *J Bacteriol*, 2004; 186: 4285-94.
7. Molinari G, Chhatwal GS. Role played by the fibronectin-binding protein SfbI (Protein F1) of *Streptococcus pyogenes* in bacterial internalization by epithelial cells. *J Infect Dis*, 1999; 179: 1049-50.
8. Ølsvik B, Olsen I, Tenover FC. Detection of *tet(M)* and *tet(O)* using the polymerase chain reaction in bacteria isolated from patients with periodontal disease. *Oral Microbiol Immunol*, 1995; 10: 87-92.
9. Palmieri C, Vecchi M, Littauer P, Sundsfjord A, Varaldo PE, Facinelli B. Clonal spread of macrolide- and tetracycline-resistant [*erm(A) tet(O)*] *emm77* *Streptococcus pyogenes* isolates in Italy and Norway. *Antimicrob Agents Chemother*, 2006; 50: 4229-30.
10. Robinson DA, Sutcliffe JA, Tewodros W, Manoharan A, Bessen DE. Evolution and global dissemination of macrolide-resistant group A streptococci. *Antimicrob Agents Chemother*, 2006; 50: 2903-2911.
11. Spinaci C, Magi G, Zampaloni C, et al. Genetic diversity of cell-invasive erythromycin-resistant and -susceptible group A streptococci determined by analysis of the *RD2* region of the *prtF1* gene. *J Clin Microbiol*, 2004; 42: 639-44.
12. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol*, 1995; 33: 2233-9.
13. Varaldo PE, Debbia EA, Nicoletti G, et al. Nationwide survey in Italy of treatment of *Streptococcus pyogenes* pharyngitis in children: influence of macrolide resistance on clinical and microbiological outcomes. *Clin Infect Dis*, 1999; 29: 869-873.