

Studio sulla presenza del gene *mecA* nei ceppi di *Staphylococcus aureus* isolati dal coniglio: risultati preliminari

Cocchi M., Bacchin C., Bano L., Drigo I., Agnoletti F.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Italy

Corresponding Author: Monia Cocchi, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie. V.le B.ta Treviso 13/a, 31100 Treviso, Italy. Tel. +39 0422 302302 - Fax: +39 0422 421154 - Email: mcocchi@izsvenezie.it

ABSTRACT: Study about *mecA* gene's prevalence in *S. aureus* strains isolated in rabbit farm: preliminary results. The continuously high prevalence of methicillin resistant staphylococci (MRSA) throughout the world, accompanied by the multiresistance pattern to antimicrobial agents is of relevant concern in public health. MRSA strains are associated with the presence of the penicillin binding protein (PBP)2a, encoded by *mecA* gene. Recently, MRSA was found in meat products. Initially, MRSA infections were a nosocomial problem; in the early 1980s cases of community-acquired MRSA have been described in persons without exposure to hospital or to other risk factors. In this paper we describe the detection of *mecA* gene by PCR in 73 strains of *S. aureus* isolated during staphylococcal infections in rabbit. Moreover the correlation between presence of *mecA* gene and resistance to oxacillin and cloxacillin was evaluated. Results indicate that all the strains don't harbour the *mecA* gene. Susceptibility to the antibiotics suggests that all the strains are sensitive to oxacillin and 72/73 to cloxacillin. Only 14% are penicillin resistant.

Key words: *S. aureus*, *mecA* gene, Rabbit.

INTRODUZIONE *S. aureus*, batterio commensale sia nell'uomo che nell'animale, può causare patologie spesso difficilmente controllabili dagli agenti antimicrobici, verso i quali presenta numerosi meccanismi di resistenza; tra di essi, il più importante è quello che codifica la resistenza alla meticillina. Nei ceppi MRSA (MRSA= *methicillin resistant Staphylococcus aureus*) questa resistenza è codificata da un gene a localizzazione cromosomiale, denominato *mecA*. Esso codifica per una proteina, la *penicillin binding protein*, PBP 2a che permette ai ceppi MRSA di continuare la sintesi della parete batterica in presenza di antibiotici beta lattamici (Shukla, 2005). Tale regione cromosomiale contiene inoltre geni regolatori dell'espressione e geni di resistenza addizionali (p.e. resistenza alle tetracicline), che permettono al batterio di acquisire resistenza verso altre classi di antibiotici. Le infezioni da MRSA, inizialmente associate all'ambiente nosocomiale, sono oggi descritte in soggetti che non presentano esposizione all'ambiente ospedaliero o ad altri fattori di rischio, costituendo così un problema emergente di sanità pubblica (Jones *et al.*, 2002). Alla fine degli anni '90, la situazione epidemiologica è stata ulteriormente aggravata dalla comparsa di ceppi caratterizzati da una diminuita sensibilità alla vancomicina. Il cambiamento nell'epidemiologia delle infezioni stafilococciche, determinato anche dall'identificazione di ceppi MRSA in prodotti di origine animale (Diederer *et al.*, 2007), ha indotto diversi paesi ad adottare politiche di sorveglianza e di controllo sanitario. Scopo del presente lavoro è stato indagare circa la presenza del gene *mecA* in

ceppi di *S. aureus* isolati da coniglio e valutare la correlazione fra la presenza di tale gene e l'alone di inibizione all'oxacillina ed alla cloxacillina. Per quanto concerne la sensibilità agli antimicrobici, la scelta di utilizzare l'oxacillina e la cloxacillina (come proposto in letteratura) al fine di predire la sensibilità agli antibiotici β -lattamici è determinato dal fatto che entrambe le molecole sono dotate di maggiore stabilità rispetto alla meticillina. Alcuni MRSA, inoltre, possono da un lato presentare una natura eterogenea nella resistenza alla meticillina, e dall'altro possono apparire falsamente sensibili ad alcuni β lattamici quando testati *in vitro*.

MATERIALI E METODI - Ceppi batterici. Per questo studio sono stati utilizzati 73 ceppi di *S. aureus* isolati da conigli affetti da patologia respiratoria, cutanea o da mastite. **Test di sensibilità agli antibiotici.** Partendo da una coltura pura di *S. aureus* è stato allestito per ognuno dei ceppi un antibiogramma con tecnica Kirby-Bauer utilizzando i seguenti dischetti di antibiotico: ampicillina (AM10) 10 μ g, penicillina (P10) 10 μ g, oxacillina (OX1) 10 μ g, (Becton Dickinson) e cloxacillina (OB5) 5 μ g (Oxoid). **Estrazione acido nucleico.** E' stata eseguita l'estrazione del DNA partendo da una sospensione batterica stemperata in Heart Infusion Broth utilizzando il kit commerciale "GeneElute Bacterial genomic DNA kit" (Sigma-Aldrich). **PCR.** La mastermix è stata sottoposta ai seguenti cicli: denaturazione 95°C, 4 sec, cui seguono 25 cicli così suddivisi: 95°C, 15 sec – annealing 55°C, 30 sec - 72°C, 30 sec. Ciclo finale a 72°C per 5 min. I primers utilizzati sono descritti nella tabella 1.

Tabella 1. Primers utilizzati e lunghezza del frammento

Gene	Primers	Sequenza oligonucleotidica (5'-3')	Lunghezza frammento	Riferimento bibliografico
<i>mecA</i>	MecA_for	AAAATCGATGGTAAAGGTTGGC	530	Louie <i>et al.</i> , 2002
	MecA_rev	AGTTCTGCAGTACCGGATTTGC		

Per quanto concerne il controllo positivo, sia nell'allestimento dell'antibiogramma che delle reazioni biomolecolari, è stato utilizzato il ceppo *S. aureus* DSMZ 11729 *mecA* positivo (Schaeffler *et al.*, 1981).

Gli amplificati sono stati esaminati con elettroforesi in gel di agarosio al 2,0% (p/V), addizionato di etidio bromuro e l'immagine è stata acquisita tramite Gel Logic System (Kodak).

RISULTATI E CONCLUSIONI – Sensibilità agli antimicrobici. Lo studio condotto ha messo in evidenza che 72/73 ceppi risultano sensibili all'oxacillina, mentre un ceppo presenta un fenotipo intermedio. Nel caso della cloxacillina, invece, tutti i ceppi testati mostrano sensibilità all'antibiotico. Per quanto concerne la penicillina, infine, la percentuale di ceppi di *S. aureus* resistenti è risultata pari al 14% (10/73); questo dato è inferiore a quanto normalmente riportato in letteratura dove si segnala una percentuale di resistenza alla penicillina, in ceppi isolati da uomo, superiore all'80% (Lowy, 2003).

Ricerca del gene *mecA*. Tutti i ceppi testati sono risultati negativi alla ricerca del gene. La correlazione fra la resistenza all'oxacillina, cloxacillina, penicillina, ampicillina e la presenza del gene *mecA* è illustrata in tabella 2.

I dati presentati in questo studio mettono in evidenza i seguenti elementi:

- Elevata sensibilità e specificità della PCR. Come già sottolineato da diversi Autori, la PCR può essere considerata il gold standard nell'identificazione dei ceppi MRSA (Chambers *et al.*, 1997).
- Elevata correlazione fra la sensibilità all'oxacillina/cloxacillina e l'assenza del gene *mecA* nei ceppi testati. Nel nostro caso un ceppo intermedio nei confronti dell'oxacillina, è risultato negativo alla ricerca del gene.
- Assenza del gene *mecA* nei ceppi di *S. aureus* isolati dal coniglio.

Le recenti segnalazioni circa la presenza dei ceppi MRSA in prodotti di origine animale (Diederer *et al.*, 2007), costituiscono motivo di attenzione nei confronti di questo patogeno in ambito zootecnico. L'elevata accuratezza della PCR permette di individuare rapidamente i ceppi MRSA, monitorando così l'eventuale comparsa e diffusione del gene *mecA* nel comparto cunicolo.

Tabella 2. Correlazione fra la presenza del gene *mecA*, e la resistenza a oxacillina, cloxacillina, penicillina e ampicillina

ANTIBIOTICI	N. ceppi testati		N. ceppi testati con tecnica Kirby-Bauer						PCR per ricerca <i>mecA</i>		MEDIA E DEV. STANDARD
	P	%	S	%	R	%	I	%	N pos	N neg	
P10	73		63	86	10	14	0	0	0	73	
AM10			63	86	10	14	0	0	0	73	
OX1			72	98,6	0	0	1	1,4	0	73	22,40±3,01
OB5			73	100	0	0	0	0	0	73	28,45± 3,50
			Break points (aloni di inibizione espressi in mm)								
			R		I		S				
		Penicillina	≤28		---		≥ 29				
		Ampicillina	≤28		---		≥ 29				
		Oxacillina	≤10		11-12		≥ 13				
		Cloxacillina	≤17		---		≥ 18				

BIBLIOGRAFIA - Diederer, B.M.W., van Loo, J.H.M., Savelkoul, P., Woudenberg, J.H.C., Roosendaal, R., Verhulst, C., van Keulen, P.H.J., Kluytmans, J.A.J.W., 2007. Low prevalence of non-typable methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in meat products in the Netherlands. Proc. 7th International Symposium on the epidemiology and control of foodborne pathogens in pork, Verona, Italia, 398-401. **Jones**, T. F., Kellum, M. E., Porte, S.S., Bell, M., Schaffner, W., 2002. An outbreak of community acquired foodborne illness caused by methicillin –resistant *Staphylococcus aureus*. Emerging Inf. Dis. 8:82-84. **Louie** L., Goodfellow, J., Mathieu P., Glatt, A., Louie M., Simor, AE, 2002. Rapid detection of methicillin resistant staphylococci from blood culture bottles by using a multiplex PCR assay. J Clin Microbiol, 40(8): 2786-2790. **Lowy**, F.D., 2003. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. J. Clin. Invest, 111: 1265-1273. **Schaefer**, S., Jopnes, D., Perry, W., Ruvinskaya, L., Baradet, T., Mayr, E., Wilson, ME., 1981. Emergence of gentamicin and methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains in New York city hospitals. J. Clin. Microbiol. 13(4):754-759. **Shukla**, S.K., 2005. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and its emerging virulence. Clinical Medicine and Research. 2:57-60.