

***Staphylococcus aureus* in Fibrosi Cistica: aspetti microbiologici e diagnostici.**

Graziana Manno

**Laboratorio Generale di Analisi
Sezione Microbiologia della Fibrosi Cistica
Istituto G. Gaslini e Università degli Studi
Largo G. Gaslini 5 - 16147 Genova
Tel 0105636-290**

**Email graziana.manno@unige.it;
grazianamanno@ospedale-gaslini.ge.it;**

La colonizzazione delle vie aeree da parte di *Staphylococcus aureus* (SA) è frequente nei pazienti affetti da Fibrosi Cistica (FC), in particolare quelli d'età pediatrica. Quando la FC fu descritta per la prima volta, la maggior parte dei pazienti sopravviveva fino all'età di 5 anni ed il germe principalmente responsabile delle infezioni polmonari era rappresentato appunto da SA.

Attualmente, nella prima decade di vita, il 25-30% dei pazienti presentano positività per SA nelle colture di espettorato. Tale frequenza è probabilmente sottostimata nei bambini che non espettorano, nei quali la colonizzazione può solo essere dimostrata mediante colture del BAL. L'infezione da SA è solitamente sintomatica, ma è talvolta presente anche un carriage asintomatico.

Studi di genotipizzazione di ceppi di SA isolati da pazienti FC, hanno mostrato la stretta correlazione tra ceppi isolati dalle narici e quelli isolati dall'espettorato, suggerendo che la colonizzazione iniziale della mucosa nasale con SA, mette le basi per la successiva infezione delle basse vie respiratorie. L'infezione da SA normalmente precede la colonizzazione cronica delle vie respiratorie da parte di *Pseudomonas aeruginosa*, continua nell'età adulta con il 50% e oltre dei pazienti con colture positive per SA. La somministrazione di antibiotici è spesso inefficace nell'eradicare SA dal pomone FC, anche di ceppi antibiotico sensibili, in generale si hanno infezioni ricorrenti da parte dello stesso ceppo iniziale

Il ruolo di SA nella progressione della malattia polmonare in FC rimane non chiaro, ma l'osservazione clinica di una rapida ri-colonizzazione dopo trattamento antibiotico, suggerisce che SA riesce a persistere all'interno delle cellule del polmone, e produrre infezioni ricorrenti. L'infezione da SA è sicuramente favorita da fattori FC-specifici; infatti, nonostante il 30% circa degli individui sani siano carriers nasali di SA, l'infezione delle basse vie respiratorie non è presente in questa popolazione. La patogenesi dell'infezione stafilococcica nei pazienti FC è complessa: SA possiede sulla sua superficie batterica una grande varietà di molecole, in genere di natura proteica, in grado di legarsi alle membrane, agendo come adesine per differenti strutture superficiali. Sull'epitelio polmonare vi sono recettori per queste adesine: glicolipidi di membrana, fibronectina, collagene, laminina, vitronectina e proteoglicani. Questi

fattori, spiegano la possibilità per SA di infettare e persistere nelle basse vie respiratorie in FC. La persistenza e la dinamica delle infezioni polmonari da SA in FC, unite alla ridotta viscosità ed all'insufficiente clearance polmonare, favoriscono l'insorgenza di una sottopopolazione di ceppi con fenotipo denominato small colony variant (SCV), con caratteristiche morfologiche notevolmente diverse da quelle normalmente conosciute e studiate nei ceppi wild-type di SA. Caratteristica di tali ceppi è di crescere con colonie puntiformi, non emolitiche e non pigmentate in agar sangue, e di essere auxotrofi per timidina e/o emina e/o menadione per un blocco del trasporto degli elettroni.

Il fenotipo SCV risulta una forma adattativa in risposta ai fattori di stress a cui è sottoposto SA nell'ambiente polmonare. La diminuita espressione di alfa-emolisina da parte dei ceppi SA-SCV permette loro di sopravvivere all'interno delle cellule. Questa localizzazione intracellulare li protegge dalle difese dell'ospite e dalla pressione degli antibiotici che non riescono a penetrare all'interno della cellula eucariotica. L'alterazione del trasporto degli elettroni si traduce in un decremento dell'"uptake" degli agenti antimicrobici che richiedono un trasporto attivo per penetrare all'interno della cellula microbica (es. aminoglicosidi). La lenta crescita dei ceppi SCV è un altro fattore che riduce gli effetti dei farmaci, come i beta-lattamici, attivi sui batteri in fase di rapida crescita. Molti ceppi SCV isolati in FC presentano auxotrofismo verso la timidina, e la loro emergenza può essere correlata a terapie di lunga durata condotte, ad esempio con corticosteroidi. Gli isolati di SA-SCV in genere mostrano un grado più elevato di resistenza agli antibiotici dei ceppi con fenotipo normale; inoltre i pazienti colonizzati da questi fenotipi sono più grandi e co-colonizzati da *P.aeruginosa* e mostrano condizioni cliniche più compromesse rispetto ai pazienti colonizzati solo dal fenotipo normale. In contrasto con la crescita di SA "wild-type" su agar sangue, gli SCV timidina-dipendenti crescono in colonie, dette a "uovo fritto" con bordi traslucidi e una piccola parte centrale pigmentata, o anche in colonie tipo "pin point" che sono circa 10 volte più piccole delle normali colonie di SA.

Altri fenotipi di SA riscontrati nei pazienti FC sono i ceppi mucosi, produttori di biofilm. Inizialmente fu usato in letteratura il termine "slime" per descrivere la sostanza mucosa di alcune colonie di ceppi di *Staphylococcus*, in seguito si scoprì che tale "slime" era, nella maggior parte dei casi, un'adesina intracellulare polisaccaridica che consolida l'adesione batterica e promuove la produzione di biofilm. Il biofilm svolge un ruolo importante nella protezione dei microrganismi sia dall'azione di antibiotici, mantenendo vitali i germi al suo interno, sia dalle difese aspecifiche e specifiche dell'organismo ospite quali la fagocitosi, l'attività degli anticorpi e del complemento.

In aumento nei pazienti FC, ed un problema sia terapeutico, sia di controllo delle infezioni, sono i ceppi di SA resistenti alla meticillina (MRSA). E' ancora tuttavia da chiarire il reale ruolo di MRSA nel decorso della malattia polmonare. La resistenza alla meticillina è da mettere in relazione alla presenza del gene *mecA* che codifica la PBP2a. Il gene *mecA* (2,1 kb) è inserito in un blocco più ampio di DNA (fino a 60 kb), denominato *staphylococcal chromosomal cassette (SCCmec)*, che è incorporato nel cromosoma di SA in un sito specifico.

Come *SCCmec* s'intende una nuova classe di elementi mobili che, oltre ai geni *mec* e ai geni delle recombinasi responsabili della mobilità, contengono i determinanti di resistenza per vari antibiotici.

L'isolamento e l'identificazione degli SA-SCV possono essere difficile per i microbiologi clinici in quanto il tipo di crescita, tipicamente più lenta, l'assente o minore pigmentazione e l'assenza d'emolisi, conducono ad un riconoscimento difficoltoso di questi fenotipi nelle colture primarie di campioni d'espettorato. Inoltre, il pervenire ad una corretta identificazione di specie è spesso problematico. Le metodiche di laboratorio standardizzate (disco-diffusione, diluizioni in brodi) e normalmente utilizzate per la determinazione della sensibilità agli antibiotici dei ceppi wild-type, non sono applicabili ai ceppi SCV a causa della loro lenta crescita e delle loro esigenze culturali (auxotrofismo). Ne risulta quindi che una corretta determinazione della sensibilità ai farmaci antimicrobici di questo fenotipo è di difficilmente ottenibile.

Attualmente, nella popolazione di pazienti FC, si assiste ad un incremento della frequenza d'isolamento di ceppi MRSA, alcuni di loro presentano un fenotipo SCV. Questi ceppi possono diffondersi nella comunità dei pazienti FC al pari degli MRSA con fenotipo normale con evidenti implicazioni nella gestione del controllo delle infezioni nei Centri Regionali per la cura dei pazienti affetti da FC.

Alcuni MRSA, ma anche alcuni ceppi di MSSA (SA - meticillino sensibili) possono produrre tossine citolitiche, tra cui una denominata Panton-Valentine leucocidina, tossica per molte cellule (leucociti, eritrociti, macrofagi, piastrine, fibroblasti). Questi ceppi sono in grado di causare gravi infezioni cutanee e polmonari. Sono stati descritti casi di infezione da ceppi di SA che veicolano questa leucocidina anche tra i pazienti affetti da Fibrosi Cistica.

Isolamento e identificazione fenotipica dei ceppi SA- SCV

I campioni delle vie aeree, devono essere processati e coltivati in accordo alle linee guida nazionali per i pazienti FC. Dopo almeno 48h d'incubazione, si esegue la ricerca culturale di SA:

- tutti i diversi morfotipi positivi per la fermentazione del mannitolo presenti sul MSA (Mannitol Salt Agar) devono essere i sub-colturati contemporaneamente in agar sangue (AS) e terreno semplice (es agar Mueller-Hinton)
- si procede con un'ulteriore incubazione per 24h a 35° C.

NB Le varianti SCV sono definite sulla base della crescita in AS con colonia puntiforme, assenza d'emolisi e pigmento, e mancata crescita in terreno semplice privo di timidina e/o emina e/o menadione. .

- Eseguire l'identificazione di specie dalle colture pure mediante: prova della catalasi, Latex-agglutinazione per clumping-factor e proteina A (es Pastorex Staph Plus, Biorad) ed eventuale confermare con tests biochimici. NB l'API ID 32 Staph, (bioMérieux), con incubazione di 24-48 ore si è dimostrato il sistema migliore nell'identificazione di specie dei ceppi SA-SCV.

Conferma di specie mediante test molecolari. I ceppi fenotipicamente identificati come SA-SCV possono essere confermati con test molecolari, mediante, ad esempio, l'amplificazione del gene specie specifico della termonucleare di SA (gene *nuc*).

Caratterizzazione del tipo di auxotrofismo. Per caratterizzare il tipo di auxotrofismo, si utilizzano dischetti contenenti soluzioni di emina, menadione e timidina. Per l'emina i dischetti commerciali X-Factor (Oxoid) in uso per la determinazione delle esigenze nutrizionali di *Haemophilus* spp.; per la timidina e il menadione, dei dischetti sterili sono impregnati con 15 mcg/ml di una soluzione contenente 100 mcg/ml di timidina o di una soluzione contenente 10 mcg/ml di menadione. Per la determinazione dell'auxotrofismo, seminare delle piastre di Mueller Hinton agar (normalmente prive di timidina, emina e menadione) con una sospensione batterica pari allo 0.5 della scala di Mc Farland; in seguito deporre opportunamente i dischetti contenenti emina, timidina e menadione. L'auxotrofismo si evidenzia, dopo 24h d'incubazione a 35°C, da un alone di crescita batterica intorno ad uno o più dischetti testati.

Test fenotipici di sensibilità agli antibiotici. Per la valutazione della sensibilità ai farmaci antibatterici e la meticillina resistenza dei ceppi di SA-SCV, è consigliata la metodica standardizzata della disco-diffusione su Mueller-Hinton con il 5% di sangue di montone, in cui è testato il dischetto di cefoxitina. Infatti il Mueller-Hinton agar semplice e l'oxacillin-screening agar, in quanto terreni semplici, non permettono la crescita dei ceppi SA-SCV. Le piastre devono essere incubate per 24h a 35°C, i risultati devono essere interpretati secondo i *breakpoints* proposti dal CLSI (Clinical Laboratory Standard Institute) per SA. Un valido terreno per uno screening dalle colonie di SCV per la meticillina resistenza è l'MRSA agar (Bio Merieux). Per l'identificazione della meticillina resistenza può essere utilizzato anche l'MRSA-Screen latex agglutination test.

Determinazione molecolare della meticillina-resistenza. La meticillina resistenza nei ceppi SCV può essere confermata mediante PCR, evidenziando la presenza del gene *mecA*.

BIBLIOGRAFIA

- Goerke C, Gressinger M, Endler K, Breikopf C, Wardecki K, Stern M, Wolz C, Kahl BC. High phenotypic diversity in infecting but not in colonizing *Staphylococcus aureus* populations. *Environ Microbiol.* 2007 Dec;9(12):3134-42.
- Moore ZS, Jerris RC, Hilinski JA. High prevalence of inducible clindamycin resistance among *Staphylococcus aureus* isolates from patients with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros.* 2007 Aug 23
- Ridder-Schaphorn S, Ratjen F, Dübbers A, Häberle J, Falk S, Küster P, Schuster A, Mellies U, Löwe B, Reintjes R, Peters G, Kahl BC. Nasal *Staphylococcus aureus* carriage is not a risk factor for lower-airway infection in young cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol.* 2007 Sep;45(9):2979-84.
- Tramper-Stranders GA, van der Ent CK, Gerritsen SA, Fleer A, Kimpen JL, Wolfs TF. Macrolide-resistant *Staphylococcus aureus* colonization in cystic fibrosis patients: is there transmission to household contacts? *J Antimicrob Chemother.* 2007 Sep;60(3):665-8. Epub 2007 Jun 29.

- Elizur A, Orscheln RC, Ferkol TW, Dunne WM Jr, Storch GA, Cannon CL. Transmission of Panton-Valentine leukocidin-positive *Staphylococcus aureus* between patients with cystic fibrosis. *J Pediatr*. 2007 Jul;151(1):90-2.
- Ren CL, Morgan WJ, Konstan MW, Schechter MS, Wagener JS, Fisher KA, Regelmann WE; The Investigators and Coordinators of the Epidemiologic Study of Cystic Fibrosis. Presence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in respiratory cultures from cystic fibrosis patients is associated with lower lung function. *Pediatr Pulmonol*. 2007 Jun;42(6):513-8.
- Elizur A, Orscheln RC, Ferkol TW, Atkinson JJ, Dunne WM Jr, Buller RS, Armstrong JR, Mardis ER, Storch GA, Cannon CL. Panton-Valentine Leukocidin-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* lung infection in patients with cystic fibrosis. *Chest*. 2007 Jun;131(6):1718-25
- Vergison A, Denis O, Deplano A, Casimir G, Claeys G, DeBaets F, DeBoeck K, Douat N, Franckx H, Gigi J, Ieven M, Knoop C, Lebeque P, Lebrun F, Malfroot A, Paucquay F, Pierard D, Van Eldere J, Struelens MJ. National survey of molecular epidemiology of *Staphylococcus aureus* colonization in Belgian cystic fibrosis patients. *J Antimicrob Chemother*. 2007 May;59(5):893-9
- Besier S, Smaczny C, von Mallinckrodt C, Krahl A, Ackermann H, Brade V, Wichelhaus TA. Prevalence and clinical significance of *Staphylococcus aureus* small colony variants in cystic fibrosis lung disease. *J Clin Microbiol*. 2006 Nov 15
- von Eiff C, Peters G, Becker K. The small colony variant (SCV) concept -- the role of staphylococcal SCVs in persistent infections. *Injury*. 2006 May;37 Suppl 2:S26-33.
- Kipp F, Kahl BC, Becker K, Baron EJ, Proctor RA, Peters G, von Eiff C. Evaluation of two chromogenic agar media for recovery and identification of *Staphylococcus aureus* small-colony variants. *J Clin Microbiol*. 2005 Apr;43(4):1956-9.
- Brouillette E, Martinez A, Boyll BJ, Allen NE, Malouin F. Persistence of a *Staphylococcus aureus* small-colony variant under antibiotic pressure in vivo. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2004 May 1;41(1):35-41
- Kipp F, Becker K, Peters G, von Eiff C. Evaluation of different methods to detect methicillin resistance in small-colony variants of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol*. 2004 Mar;42(3):1277-9.
- Kahl BC, Duebbers A, Lubritz G, Haeberle J, Koch HG, Ritzerfeld B, Reilly M, Harms E, Proctor RA, Herrmann M, Peters G. Population dynamics of persistent *Staphylococcus aureus* isolated from the airways of cystic fibrosis patients during a 6-year prospective study. *J Clin Microbiol*. 2003 Sep;41(9):4424-7.
- Kahl BC, Belling G, Reichelt R, Herrmann M, Proctor RA, Peters G. Thymidine-dependent small-colony variants of *Staphylococcus aureus* exhibit gross morphological and ultrastructural changes consistent with impaired cell separation. *J Clin Microbiol*. 2003 Jan;41(1):410-3.
- Sadowska B, Bonar A, von Eiff C, Proctor RA, Chmiela M, Rudnicka W, Rozalska. Characteristics of *Staphylococcus aureus*, isolated from airways of cystic fibrosis patients, and their small colony variants. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2002 Feb 18;32(3):191-7
- von Eiff C, Proctor RA, Peters G. *Staphylococcus aureus* small colony variants: formation and clinical impact. *Int J Clin Pract Suppl*. 2000 Dec;(115):44-9. Review.
- Looney WJ. Small-colony variants of *Staphylococcus aureus*. *Br J Biomed Sci*. 2000;57(4):317-22

- Kahl B, Herrmann M, Everding AS, Koch HG, Becker K, Harms E, Proctor RA, Peters G. Persistent infection with small colony variant strains of *Staphylococcus aureus* in patients with cystic fibrosis. *J Infect Dis.* 1998 Apr;177(4):1023-9.
- Proctor RA, van Langevelde P, Kristjansson M, Maslow JN, Arbeit RD. Persistent and relapsing infections associated with small-colony variants of *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis.* 1995 Jan;20(1):95-102.
- Proctor RA, Balwit JM, Vesga O. Variant subpopulations of *Staphylococcus aureus* as cause of persistent and recurrent infections. *Infect Agents Dis.* 1994 Dec;3(6):302-12.