

## FULL PAPERS /LAVORI ORIGINALI

## DNA-fingerprinting di stipiti di *Chryseobacterium spp* isolati da pazienti con Fibrosi Cistica

Antonietta Lambiase<sup>1</sup>, Mariassunta Del Pezzo<sup>1</sup>, Valeria Raia<sup>2</sup>, Pasqualina Ferri<sup>2</sup>,  
Giovanna Pulcrano<sup>1</sup>, Fabio Rossano<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Biologia e Patologia Cellulare e Molecolare "Luigi Califano", Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università di Napoli "Federico II";

<sup>2</sup>Centro di Riferimento Regionale per la Fibrosi Cistica, Dipartimento di Pediatria, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università di Napoli "Federico II".

**Key words:** Cystic Fibrosis, emerging pathogens, antibiotic-resistance, PFGE.

### DNA-fingerprinting of *Chryseobacterium spp* strains isolated from Cystic Fibrosis patients

#### SUMMARY

**Objectives:** Pulmonary infections by Gram-negative bacteria, as *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia*, are the major cause of morbidity in Cystic Fibrosis patients. In the past decade, several pathogens as *Alcaligenes spp* and no tuberculosis mycobacteria have been recovered in these patients.

Bacteria of genus *Chryseobacterium* are widespread Gram-negative microorganisms and involved in human infections. Aims of this study were to value the isolation frequency of *Chryseobacterium* strains in a cohort of Cystic Fibrosis patients, to investigate their antimicrobial sensibility and to establish possible clonal likeness between strains.

**Methods:** A retrospective study was undertaken between January 2003 and December 2005 on 300 patients receiving care at the Regional Cystic Fibrosis Centre of Naples University "Federico II".

Sputum samples were checked: for bacterial identification, selective media and commercial identification systems were used. The activity of antimicrobial agents was determined using diffusion and microdilution methods. For DNA-fingerprinting, a genomic DNA macrorestriction followed by pulsed-field electrophoresis was carried out.

**Results:** A total of 26 strains from 17 patients were isolated (7 *C. meningosepticum*, 14 *C. indologenes*, 5 *C. gleum*). Strains were resistant to cephalosporins and carbapenems; some were sensitive to ciprofloxacin, levofloxacin and trimethoprim-sulphamethoxazole. Macrorestriction analysis showed substantial heterogeneity among strains.

**Conclusions:** Actually, the prognostic role of *Chryseobacterium* in Cystic Fibrosis is unclear and although the small number of isolations, it is need to be on the look out regard such microorganisms. The considerable resistance implies difficulties on therapeutic approach.

Results of DNA-fingerprinting indicate no evidence of clonal likeness and then of patient-to-patient spread.

#### INTRODUZIONE

L'infezione batterica polmonare rappresenta la principale causa di decesso in pazienti con Fibrosi Cistica (FC). L'eccessiva risposta infiammatoria ai batteri è una caratteristica peculiare di tale patologia ed è tuttora controverso se sia l'infezione stessa a scatenare l'infiammazione o se nei tessuti esista un'alterazione intrinseca della risposta infiammatoria. Certamente, l'azione patogena dei microrganismi e l'infiammazione diffusa secondaria all'effetto della risposta immunitaria, portano ad un danno polmonare progressivo con rimaneggiamento fibroso-cicatriziale del tessuto polmonare fino all'insufficienza respiratoria e morte (2, 6, 12, 14, 15). Durante la prima decade di vita, i patogeni polmonari comunemente isolati sono *Staphylococcus aureus* ed *Haemophilus influenzae*, mentre *Pseudomonas aeruginosa* rappresenta il patogeno più frequente nell'adolescenza.

Recentemente, nuovi patogeni polmonari sono

stati isolati in pazienti con FC, quali *Stenotrophomonas maltophilia*, *Alcaligenes xylosoxidans* e *Burkholderia cepacia* (15). L'uso estensivo di antibiotici, mirato soprattutto al controllo delle colonizzazioni e delle infezioni croniche sostenute da *Pseudomonas aeruginosa*, potrebbe essere una delle cause dell'espansione dell'eziologia microbica e quindi dell'incremento di nuovi isolamenti dal tratto respiratorio di pazienti con FC (1, 7). D'altronde, l'uso dei chemioterapici è responsabile anche della selezione di patogeni classici connotati da meccanismi di resistenza particolari, come i ceppi di *Staphylococcus aureus* resistenti alla meticillina. I batteri del genere *Chryseobacterium* sono bacilli Gram-negativi non fermentanti, normalmente riscontrabili in natura (11). Il genere *Chryseobacterium* fu creato per distinguere diverse specie batteriche dal genere *Flavobacterium*, in base a studi genetici e filogenetici condotti su

ceppi della famiglia delle *Flavobacteriaceae*. Sebbene tutti questi batteri siano piuttosto correlati, il genere *Flavobacterium* comprende specie essenzialmente confinate in ambienti sia solidi che acquatici. Il genere *Chryseobacterium* invece comprende specie molto diffuse, ed alcune di queste sono coinvolte in infezioni nosocomiali, agendo come occasionali ma seri patogeni opportunisti (3, 17).

In pazienti affetti da FC, l'isolamento di ceppi di *Chryseobacterium* non è ad oggi molto frequente. Nel contempo, però, è noto che in tali pazienti si verifica un'espansione dell'eziologia microbica responsabile di infezioni polmonari.

Il nostro studio è finalizzato alla:

- 1) determinazione della frequenza di isolamenti batterici di *Chryseobacterium*, ottenuti da pazienti affetti da FC, regolarmente seguiti presso il Centro di Riferimento Campano;
- 2) valutazione del profilo di sensibilità agli antibiotici da parte di tali ceppi;
- 3) ricerca di eventuali relazioni clonali fra ceppi.

## MATERIALI E METODI

### Descrizione della popolazione in studio

Lo studio retrospettivo è stato effettuato nel periodo compreso fra gennaio 2003 e dicembre 2005 su 300 pazienti FC (età media 16.21 anni, range 0.5-50 anni), regolarmente seguiti presso il Centro di Riferimento Regionale per la FC dell'Università di Napoli "Federico II".

### Culture dei microrganismi ed analisi fenotipica

I campioni di espettorato naturale o indotto (da 1 fino ad un massimo di 4 campioni per mese) sono stati processati per le analisi batteriologiche.

I campioni giunti in laboratorio sono stati uniti con un uguale volume di soluzione all'1% di Ditiotritolo (Merck, Germany) per la fluidificazione e poi incubati a 37°C per 30 min ed esaminati microscopicamente. La semina per la ricerca di batteri e miceti è stata fatta contemporaneamente su terreni Agar Sangue, Agar Mac Conkey, Agar Sabouraud, Agar CNA ed Agar Cioccolato. L'incubazione è stata fatta in aerobiosi a temperatura di 37°C per 24 ore e fino ad un massimo di 48 ore per i microrganismi a crescita più lenta. Per la ricerca di emofili, l'incubazione è avvenuta in microaerofilia.

Per isolare i ceppi di *Chryseobacterium*, i campioni sono stati insembrati anche su piastre di BCSA (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) ed incubati a 37°C per 24-48 ore in condizioni di aerobiosi. Tutti gli isolati ottenuti dall'esame colturale sono stati sottoposti ad identificazione biochimica tramite il sistema automatico Phoenix (Becton Dickinson): i ceppi identificati come

*Chryseobacterium* sono stati sottoposti ad identificazione di conferma con il sistema API 20 NE (bioMérieux). La preparazione degli inoculi, i tempi di incubazione, le temperature di crescita e l'interpretazione delle avvenute reazioni sono state eseguite rispettando le istruzioni date dalle ditte fornitrici i sistemi.

### Studio della sensibilità agli antibiotici

Per tale studio sono stati utilizzati metodi in agar-diffusione (Kirby-Bauer) ed in microdiluizione, eseguiti per i seguenti antibiotici: amikacina, ampicillina/sulbactam, aztreonam, cefepime, cefotaxime, ceftazidime, ciprofloxacina, levofloxacina, cloramfenicolo, gentamicina, imipenem, meropenem, piperacillina, piperacillina/tazobactam, tetraciclina, trimetoprim/sulfametoxazolo. I criteri di sensibilità adottati rispettano i criteri interpretativi stabiliti dal National Committee for Clinical Laboratory Standards (Documento M7-A4) (13).

### Studio di genotipizzazione

Il DNA-fingerprinting è stato effettuato secondo il metodo descritto da Grothues (9). In breve, gli isolati batterici sono stati inoculati in terreno BH broth in condizioni di agitazione (120 shakes/min), in aerobiosi ad una temperatura di 37°C per 24 ore. Ottenuto poi il pellet per centrifugazione (2500 giri per 20 min), esso è stato sospeso in 1 ml di SE buffer (75 mM NaCl, 25 mM EDTA, pH 7.5) fino ad una concentrazione di 2 McFarland. La sospensione cellulare è stata poi unita con un uguale volume di 1.6% agarosio low-melting point, e poi inserita in formine per formare i plugs. I batteri intrappolati nel plug sono stati lisati a 56°C overnight con lysis buffer (1% N-lauryl sarcosine, EDTA 0.5 M, pH 8.00) addizionato con Proteinase K 1mg/ml. I plugs contenenti il DNA sono stati successivamente lavati con tampone TE e successivamente il DNA è stato digerito con l'enzima *SpeI*, rispettando le condizioni fornite dalla casa produttrice (New England Biolabs). I digesti sono stati poi separati usando il CHEF III (Bio-Rad, Inc) alle condizioni di 10°C per 19 h, con uno start time di 5s ed un end-pulse time di 35s, a condizioni di voltaggio di 6V/cm. Un concatamero di DNA del fago lambda è stato utilizzato come marcatore di peso molecolare.

I patterns sono stati comparati in accordo ai criteri stabiliti da Tenover (16). In base a tali criteri, abbiamo considerato possibilmente correlati gli isolati che presentavano patterns differenti fra loro per 4-6 bande e strettamente correlati gli isolati che presentavano patterns differenti fra loro per 2-3 bande. Gli isolati sono stati considerati differenti se i loro patterns di restrizione differivano per più di 7 bande.

**RISULTATI**

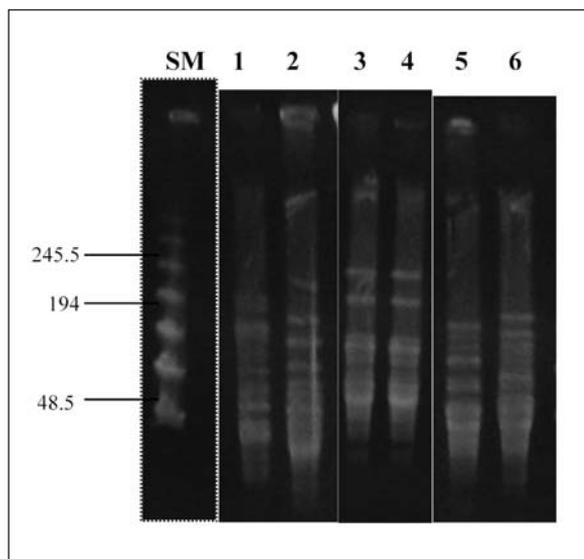
Nel periodo in studio, sono stati isolati 26 ceppi (7 *C. meningosepticum*, 14 *C. indologenes* e 5 *C. gleum*) rispettivamente da 17 pazienti. Tutti risultavano con infezione sporadica sostenuta da tale microrganismo. Inoltre tutti i pazienti risultavano colonizzati da *Pseudomonas aeruginosa* e tra questi, 10 risultavano anche con infezione da *Stenotrophomonas maltophilia* (in particolare 8 con infezione sporadica e 2 con infezione cronica). Infine, tra i 10 pazienti con infezione da *Stenotrophomonas maltophilia*, 2 pazienti risultavano anche con infezione cronica da *Burkholderia cepacia*.

La crescita di *Chryseobacterium* si evidenzia su Agar-sangue e su BCSA. Generalmente le colonie appaiono di forma circolare e convessa, con margini integri e superficie liscia. Su Agar-sangue le colonie assumono un colore iridescente mentre su BCSA esse assumono un colore giallo oca. Caratteristica di *Chryseobacterium* è l'odore fruttato delle colonie.

I sistemi identificativi applicati hanno mostrato concordanza su tutti gli isolati in studio.

Tali microrganismi hanno mostrato avere sensibilità nei confronti di ciprofloxacina (MIC<0.5), levofloxacina (MIC<1) e trimetoprim-sulfametossazolo (MIC<0.5/9.5). Hanno mostrato invece resistenza verso tutte le cefalosporine, compresa ceftazidime (MIC>16), e verso i carbapenemi (MIC>8 sia per imipenem che per meropenem), fatta eccezione per un solo ceppo risultato sensibile al meropenem (MIC<4). Per gli aminoglicosidi è stata testata la gentamicina che non è risultata efficace (MIC>8). La tabella 1 illustra le percentuali di ceppi risultati resistenti agli antibiotici testati.

L'analisi della macrorestrizione ha fatto emergere una consistente eterogeneità fra ceppi. Infatti i rispettivi patterns mostravano un'assenza di correlazione epidemiologica, tranne nel caso di due ceppi che dal conteggio delle bande risultavano possibilmente correlati (figura I).



**Figura I.** Alcuni dei più rappresentativi patterns di restrizione di DNA di isolati di *Chryseobacterium* ottenuti con enzima *SpeI* tramite PFGE. SM indica il peso molecolare. I lanes 3 e 4 rappresentano isolati strettamente correlati.

**CONCLUSIONI**

Il ritrovamento di specie inusuali da secrezioni respiratorie di pazienti FC chiaramente mostra che la biodiversità batterica nel polmone di tali pazienti non è ancora perfettamente conosciuta. I dati mostrati indicano infatti che il polmone affetto da FC è una nicchia ecologica favorevole alla crescita di una grande varietà di batteri anche non frequentemente associati a malattie umane. Attualmente, il ruolo prognostico di *Chryseobacterium* in FC non è chiaro. E' noto infatti che tale microrganismo possa essere identificato come agente eziologico di meningiti, batteriemie, polmoniti, endocarditi, infezioni della pelle e dei tessuti ed infezioni oculari (4, 5, 8, 10), ma, nell'ambito della patologia polmonare in FC non vi sono dati di letteratura. Ciò nonostante, risulta comunque indispensabile assumere un atteggiamento di allerta nei confronti di tali reper-

**Tabella 1.** Percentuali di antibiotico-resistenza dei ceppi di *Chryseobacterium* isolati

	ANTIBIOTICI															
	AMK	SAM	ATM	FEP	CTX	CAZ	CIP	LVX	CHL	GEN	IMP	MEM	PIP	TZP	TET	SXT
<i>C.i</i> (14)	100	100	100	100	100	100	92	85	92	100	100	100	100	100	100	92
<i>C.m</i> (7)	100	100	100	100	100	100	57	42	100	100	100	100	92	71	100	42
<i>C.g</i> (5)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	92	100	100	100	100	80

*C.i*= *C.indologenes*  
*C.m*= *C.meningosepticum*  
*C.g*= *C.gleum*

AMK=Amikacina; SAM=Ampicillina/Sulbactam; ATM=Aztreonam; FEP= Cefepime; CTX=Cefotaxime; CAZ=Ceftazidime; CIP=Ciprofloxacina; LVX=Levofloxacina; CHL=Cloramfenicolo; GEN=Gentamicina; IMP=Imipenem; MEM=Meropenem; PIP=Piperacillina; TZP=Piperacillina/tazobactam TET=Tetraciclina; SXT=Trimetoprim-sulfametossazolo;

ti, poiché il polmone affetto da FC rappresenta una nicchia particolare dove il perenne stato infiammatorio e l'uso continuo di antibiotici favoriscono sia la selezione di ceppi notoriamente patogeni ma con resistenze particolari, sia l'insediamento, anche transitorio, di batteri ambientali o a patogenicità condizionata quali *Chryseobacterium*.

I metodi convenzionali per l'identificazione quali le gallerie API 20 NE o i sistemi automatici come quello utilizzato nel presente studio rispondono egregiamente a tale fine. Tali batteri infatti non richiedono condizioni di crescita particolari per cui lo studio del biochimismo risulta effettuabile anche tramite sistemi in automatico.

La notevole resistenza riscontrata nei nostri isolati determina un aumento della difficoltà di impostazione di trattamenti chemioterapici. Infatti è noto che per le riacutizzazioni polmonari in FC si ricorre generalmente a cefalosporine di III generazione (ceftazidime), ad aminoglicosidi (tobramicina soprattutto per via aerosol) ed a carbapenemi (meropenem). La sensibilità dei nostri isolati ha riguardato esclusivamente i chinoloni e le benzyl-pirimidine (trimethoprim-sulfametossazolo).

Dalla tipizzazione molecolare emergono chiaramente dati che non supportano l'evidenza epidemiologica di trasmissione paziente-paziente, come invece appare con ceppi del *Burkholderia cepacia complex*, per i quali è nota la spiccata caratteristica di cross-trasmettersi tra pazienti.

Risulta comunque chiaro che lo studio della trasmissione di questo patogeno emergente necessita di approfondimenti, soprattutto per la comprensione delle sorgenti di infezione. In letteratura sono infatti descritti casi di contaminazione di strumentazione medica, in particolar modo di strumentazione che riguarda fluidi di qualsiasi genere, come gli intubatori, gli umidificatori, gli incubatori per immaturi ecc, oltre che casi di contaminazione di cateteri intravascolari e protesi generiche.

La complessità dell'ambiente polmonare in pazienti con FC impone necessariamente sia l'accurato isolamento di ogni specie batterica, anche di quelle la cui patogenicità risulta ignota, sia un preciso studio di sensibilità agli antibiotici, poiché nel fallimento terapeutico possono essere coinvolte tutte le specie soprattutto se presentano profili caratterizzati da pluresistenze.

## BIBLIOGRAFIA

1. Aaron SD, Ferris W, Henry DA, Speert DP, MacDonald E. Multiple combination bactericidal antibiotic testing for patients with Cystic Fibrosis infected with *Burkholderia cepacia*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2000; 161: 1206-1212
2. Banerjee D, Stableforth D. The treatment of respiratory *Pseudomonas aeruginosa* infection in Cystic Fibrosis: what drug and which way? *Drugs*, 2000; 60: 1053-1064
3. Bernardet JF, Nakagawa Y, Holmes B. Proposed minimal standards for describing new taxa of the family *Flavobacteriaceae* and emended description of the family. *Int J Syst Evol Microbiol* 2002; 52: 1049-1070
4. Block KC, Nadarajah R, Jabobs R. *Chryseobacterium meningosepticum*: an emerging pathogen among immunocompromised adults. Report of 6 cases and literature review. *Medicine (Baltimore)* 1997; 76: 30-41
5. Chiu CH, Waddintong M, Hsieh WS, Greenberg D, Schreckenberger PC, Carnahan AM. Atypical *Chryseobacterium meningosepticum* and meningitis and sepsis in newborns and the immunocompromised, Taiwan. *Emerg Infect Dis* 2000; 6: 481-486
6. Conway SP, Brownlee KG, Denton M, Peckham DG. Antibiotic treatment of multidrug-resistant organisms in Cystic Fibrosis. *Am J Respir Med*, 2003; 2: 321-322
7. Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry. Annual Data Report. Bethesda, 2003.
8. Du Moulin GC. Airway colonization by *Flavobacterium* in an intensive care unit. *J Clin Microbiol* 1997; 10: 155-160
9. Grothues D, U. Koopmann, H. Van der Hardt, and B. Tummler 1998. Genome fingerprinting of *Pseudomonas aeruginosa* indicates colonization of Cystic Fibrosis siblings with closely related strains. *J Clin Microbiol*. 26, 115-123
10. Hoque SN, Graham J, Kaufmann ME, Tabaqchali S. *Chryseobacterium (Flavobacterium) meningosepticum* outbreak associated with colonization of water taps in a neonatal intensive care unit. *J Hosp Infect* 2001; 47: 188-192.
11. Kirby JT, Sader HS, Walsh TR, Jones RN. Antimicrobial susceptibility and epidemiology of a worldwide collection of *Chryseobacterium spp*: report from the SENTRY antimicrobial Surveillance program (1997-2001)
12. Marchetti F, Giglio L, Canduso M, Faraguna D, Assael BM. Early antibiotic treatment of *Pseudomonas aeruginosa* colonisation in Cystic Fibrosis: a critical review of the literature. *Eur J Clin Pharmacol*, 2004; 60: 67-74
13. National Committee for Clinical Laboratory Standards: Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. 4<sup>th</sup> ed. Approved standard M7-A4. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pa; 1997
14. Saiman L, Siegel J. Infection Control recommendations for patients with Cystic Fibrosis: microbiology, important pathogens and infection control practices to prevent patient-to-patient transmission; *Am J Infect Control*, 2003; 3 (Suppl)
15. Saiman L, Siegel J. Infection Control in Cystic Fibrosis. *Clin Microbiol Rev*, 2004; 17:57-71
16. Tenover F, Arbeit R, Goering R, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial

- strain typing. J Clin Microbiol 1995; 33: 2233-2239
17. Vandamme P, Bernardet JF, Segers P, Kersters K, Holmes B. New perspectives in the classification of the *flavobacterium*: description of *Chryseobacterium* gen. nov., *Bergeyella* gen nov and *Empedobacter* nom rev Int J Syst Bacteriol 1994; 44: 827-831

**Antonietta Lambiase**

Dipartimento di Biologia e Patologia  
Cellulare e Molecolare "L. Califano"  
Facoltà di Medicina e Chirurgia  
Università di Napoli "Federico II"  
Via Pansini n°5 -80131-Napoli  
Tel.: 081 7462530 - Fax: 081 7462530  
E-mail: [alambias@unina.it](mailto:alambias@unina.it)