

**ANNALES
ACADEMIAE MEDICAE
GEDANENSIS
TOM XXXX
2 0 1 0
SUPPLEMENT 1**

GDAŃSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY

Lidia Piechowicz

**BADANIA NAD SZCZEPAMI BIOTYPU
POULTRY LIKE PROTEIN A + (P-LIKE pA+)
WYKRYTYMI W POPULACJI GRONKOWCÓW
ZŁOCISTYCH II GRUPY BAKTERIOFAGOWEJ**

*Investigations of strains
of Poultry like protein A+ biotype (P-like pA+)
in Staphylococcus aureus of phage group II population*

Praca opublikowana w procedurze
ubiegania się o uzyskanie stopnia doktora habilitowanego

Zakład Mikrobiologii Lekarskiej Katedry Mikrobiologii,
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego
Kierownik: p.o. dr n med. Maria Dąbrowska-Szponar

Gdańsk 2010

Wydano za zgodą
Senackiej Komisji Wydawnictw Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

REDAKTOR NACZELNY

EDITOR-IN-CHIEF

prof. dr Marek Grzybiak

KOMITET REDAKCYJNY

EDITORIAL BOARD

dr hab. Tomasz Bączek, dr hab. Zdzisław Bereznowski, prof. nadzw., mgr inż. Anna Grygorowicz,
prof. dr hab. Andrzej Hellmann, dr hab. Jerzy Kuczkowski, dr Włodzimierz Kuta, mgr Józefa de Laval,
prof. dr hab. Krzysztof Narkiewicz, dr hab. Michał Obuchowski, prof. nadzw.,
prof. dr hab. Zbigniew Kmiec, prof. dr hab. Stefan Raszeja - członek honorowy,
dr hab. Adam Szarszewski, prof. dr hab. Julian Świerczyński, dr hab. Aleksandra Żurowska

ADRES REDAKCJI

ADDRESS OF EDITORIAL OFFICE

Annales Academiae Medicae Gedanensis

Zakład Anatomii Klinicznej

Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

ul. Dębinki 1, 80-211 Gdańsk, Poland

e-mail: annales@gumed.edu.pl

Artykuły opublikowane w Annales AMG
są zamieszczane w bazie EMBASE

Articles published In Annales AMG are covered
by the Excerpta Medica database (EMBASE)

PL ISSN 0303-4135

Gdański Uniwersytet Medyczny

Szczególne podziękowania składam

Panu prof. dr hab.med. Januszowi Galińskiemu

za cenne rady i wskazówki niezwykle pomocne
w realizacji pracy oraz wszystkim osobom,
których udział przyczynił się do jej powstania

SPIS TREŚCI

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW	9
1. WSTĘP.....	10
1.1. Klasyfikacja gatunku <i>Staphylococcus aureus</i>	11
1.2. Szczepy ludzkie i zwierzęce gronkowców złocistych	12
1.3. Metody różnicowania szczepów <i>S.aureus</i> w badaniach epidemiologicznych.....	14
1.3.1. Metody fenotypowe.....	15
1.3.2. Typowanie genetyczne	16
1.4. Ewolucja fagotypów gronkowców złocistych	17
1.5. Rola gronkowców złocistych II grupy fagowej w zakażeniach u hospitalizowanych pacjentów	18
2. CEL PRACY	20
3. MATERIAŁ I METODY	21
3.1. Pochodzenie badanych szczepów	21
3.1.1. Szczepy <i>S.aureus</i> II grupy bakteriofagowej izolowane od ludzi.....	21
3.1.2. Szczepy <i>S. aureus</i> pochodzenia zwierzęcego	23
3.2. Szczepy wzorcowe	23
3.3. Przechowywanie szczepów	23
3.4. Identyfikacja gatunku <i>Staphylococcus aureus</i>	24
3.4.1. Odczyn na obecność czynnika CF	24
3.4.2. Test na koagulazę	24
3.4.3. Test Api ID32 Staph.....	24
3.5. Typowanie bakteriofagowe	25
3.5.1. Namnażanie i miareczkowanie fagów	25
3.5.2. Oznaczanie wzorów fagowych.....	26
3.6. Określenie biotypów.....	27
3.6.1. Oznaczanie wytwarzania fibrynolizyny	27
3.6.2. Oznaczanie wytwarzania hemolizyny β	27
3.6.3. Oznaczanie zdolności koagulowania plazmy bydlęcej.....	27
3.6.4. Oznaczanie typu wzrostu na podłożu z fioletem krystalicznym.....	28
3.6.5. Oznaczanie wytwarzania białka A metodą blottingu	28
3.7. Typowanie genetyczne	28
3.7.1. Badanie polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych genomowego DNA (PFGE)	28
3.7.2. Typowanie genu białka A (<i>spa</i>)	30
3.8. Badane cechy genotypowe	32
3.8.1. Wykrywanie genu fibrynolizyny	32
3.8.2. Wykrywanie genów toksyn gronkowcowych.....	33
3.8.3. Wykrywanie genów adhezyn gronkowcowych.....	34
3.8.4. Wykrywanie genu <i>mecA</i>	36
3.9. Badane cechy fenotypowe	36
3.9.1. Oznaczanie wrażliwości szczepów na antybiotyki.....	36
3.9.2. Oznaczanie właściwości lipolitycznych	38
3.10. Metody statystyczne.....	38
4. WYNIKI.....	39
4.1. Szczepy <i>Staphylococcus aureus</i> II grupy fagowej izolowane od ludzi	39

4.1.1. Podział na biotypy	39
4.1.2. Typowanie genetyczne	41
4.1.3. Porównawcza charakterystyka wyróżnionych kompleksów klonalnych	50
4.1.4. Występowanie szczepów P-like pA+ w materiałach klinicznych	63
4.1.5. Występowanie szczepów P-like pA+ u hospitalizowanych pacjentów i u osób spoza środowiska szpitalnego	65
4.2. Szczepy <i>Staphylococcus aureus</i> izolowane od świń i drobiu	67
4.2.1. Biotypy szczepów zwierzęcych	67
4.2.2. Porównanie gronkowców P-like pA+ izolowanych od ludzi ze szczepami <i>S. aureus</i> pochodzącymi od zwierząt	68
4.3. Końcowe porównanie szczepów P-like pA+ z pozostałymi gronkowcami pochodzącymi od ludzi i szczepami izolowanymi od świń i drobiu	74
5. DYSKUSJA	76
6. WNIOSKI	83
7. PIŚMIENNICTWO	84
8. STRESZCZENIE	99
9. SUMMARY	101

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

BSA – *Bovine Serum Albumin* / albumina plazmy bydlęcej
BURP – *Based Upon Repeat Pattern*
CF – *clumping factor* / czynnik zlepnący
CFU – *colony forming unit* / jednostka tworząca kolonie
CLSI – *Clinical and Laboratory Standards Institute*
DTP – *deoxynucleotides dATP, dDTP, dGTP, dTTP*
EMRSA – *Epidemic MRSA* / epidemiczny szczep *S. aureus* opornego na metycylinę
FnBps – *fibronectin binding proteins* / białka wiążące fibronektynę
kDa – kilodaltony
MHA – *Mueller Hinton Agar*
MIC – *Minimal Inhibitory Concentration* / najmniejsza dawka antybiotyku hamująca rozwój bakterii
ml – mililitr
μl – mikrolitr
MRSA – *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* / gronkowiec złocisty oporny na metycylinę
MSSA – *Methicillin Sensitive Staphylococcus aureus* / gronkowiec złocisty wrażliwy na metycylinę
MSRAMM – *microbial surface components recognising adhesive matrix molecules*
Multiplex PCR – *multiplex Polymerase Chain Reaction* / złożona reakcja łańcuchowa polimerazy
MLST – *Multilocus Sequence Typing*
mm – milimetr
NCCLS – *National Committee for Clinical Laboratory Standards* / Narodowy Komitet ds. Standaryzacji Klinicznych Procedur Laboratoryjnych
ng – nanogram
NHS – *non-host-specific*
NT – nie typujący się
PCR – *Polymerase Chain Reaction* / reakcja łańcuchowa polimerazy
PFGE – *pulsed-field gel electrophoresis* / elektroforeza w zmiennym polu elektrycznym
P-like pA⁺ – *Poultry like protein A positive*
PVL – *Panton Valentine Leukocidine* / leukocydyna Panton-Valentine
pmole – pikomole
pz – par zasad / *base pair*
RTD – *Routine Test Dilution*
RFLP – *Restriction Fragment Length Polymorphism* / polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych DNA
SSR – *Short Sequence Repeat* / krótkie sekwencje powtórzone
TBS – *Tris buffered saline*
TSA – *Tryptic Soy Agar* / podłoże agarowe tryptozowo-sojowe
TSB – *Tryptic Soy Broth* / podłoże bulionowe tryptozowo-sojowe
UPGMA – *unweighed pair group method with arithmetic averages*

1. WSTĘP

W latach 50. częstość zakażeń gronkowcowych w europejskich szpitalach wzrosła do niespotykanych wcześniej rozmiarów [81, 185, 219]. Było to skutkiem wprowadzenia do leczenia penicyliny, na którą gronkowce, w przeciwieństwie do innych bakterii, szybko stawały się odporne. Sytuacja ta spowodowała potrzebę lepszego poznania epidemiologii zakażeń gronkowcowych w celu opracowania skutecznych metod ich zwalczania.

Gronkowce są szeroko rozpowszechnione wśród ludzi i zwierząt oraz w otaczającym je środowisku [43, 204]. W celu wykrycia ich źródeł i dróg zakażenia konieczna jest dokładna identyfikacja szczepu, gdyż stosowany w taksonomii podział na rodzaje i gatunki jest dla dochodzenia epidemiologicznego zbyt ogólny.

W poszukiwaniu narzędzi, które pozwoliłyby na odróżnianie od siebie poszczególnych szczepów gronkowców, podjęto więc na początku lat 50. próby wykorzystania do tego celu bakteriofagów. Gdy koncepcja ta okazała się trafna, w ciągu kilku lat opracowano zasady typowania i utworzono międzynarodowy zestaw fagów. Jednocześnie w wielu krajach powstawały referencyjne ośrodki typowania gronkowców bakteriofagami, a typowanie bakteriofagowe zostało uznane za podstawową metodę identyfikacji szczepów w badaniach epidemiologicznych [9, 104, 162, 175].

Prace prowadzone w różnych krajach od lat 50., przy wykorzystaniu typowania bakteriofagowego, pozwalają na prześledzenie ewolucji szczepów gronkowcowych występujących w zakażeniach szpitalnych. Z racji dominującego znaczenia w tych zakażeniach, gronkowce I i III grupy bakteriofagowej stały się głównym przedmiotem zainteresowania wielu badaczy. Analiza wyników licznych prac wykazuje, że początkowo główną rolę w zakażeniach szpitalnych odgrywały szczepy należące do I grupy bakteriofagowej, później w latach 60. ich miejsce zajęła III grupa bakteriofagowa wykazująca większą oporność na antybiotyki. Dokładne analizy wspomnianych grup ujawniają istnienie w ich obrębie podjednostek charakteryzujących się określonymi wzorami bakteriofagowymi a także szczególnymi cechami epidemiologicznymi i lekoopornością [71, 74, 101, 102, 103, 105, 145, 185].

Gronkowce należące do II grupy, w przeciwieństwie do I i III grupy bakteriofagowej, aż do lat 80. uznawane były za florę typową dla środowiska pozaszpitalnego [179, 183]. W szpitalach częstość ich występowania utrzymywała się na poziomie nieprzekraczającym kilkunastu procent [50, 179, 181]. Dopiero w latach 80. zauważono wzrost odsetka szczepów II grupy fagowej wśród hospitalizowanych pacjentów. Na początku lat 90. osiągnął on w niektórych krajach wartość ponad dwudziestu procent [50]. Według Rosdahl i wsp. z Danii, szczepy wspomnianej grupy dominowały już wówczas nie tylko w środowisku pozaszpitalnym, ale również w szpitalach [175]. Podobne zjawisko wzrostu liczby gronkowców II grupy fagowej w środowisku szpitalnym odnotowano również w Polsce. Początkowo, w końcu lat 60. szczepy II grupy fagowej izolowano w około 10%, później – w latach 80. i 90. – występowały one z częstością ponad 2-krotnie wyższą [50, 61, 107, 108, 170, 183].

Co interesujące – zaobserwowano, że wśród szczepów II grupy fagowej poszerza się zakres oporności na antybiotyki, podczas gdy dawniej, w latach 50. były one najczęściej odporne tylko na penicylinę a wrażliwe na pozostałe antybiotyki wówczas stosowane. Badania różnych autorów prowadzone na szczepach izolowanych w ciągu następnych lat

wykazały znaczny wzrost oporności głównie na penicylinę i tetracyklinę w tej grupie szczepów [50, 53, 109, 181].

Jak wynika z wcześniej cytowanych badań, wzrost liczby zachorowań spowodowanych gronkowcami zarówno I jak i III grupy bakteriofagowej był zazwyczaj związany z rozprzestrzenieniem się określonych fagotypów [83, 85, 162, 219, 220, 222].

Powstaje więc pytanie, czy odnotowany obecnie wzrost liczby gronkowców II grupy fagowej i ich lekooporności jest wynikiem zwiększenia liczebności różnych szczepów, czy też jednego z nich. Do tego celu wykorzystywane są obecnie nowoczesne metody analizy genetycznej [98, 129, 130, 203, 207, 208]. W związku z brakiem takich badań w odniesieniu do szczepów II grupy fagowej, w obecnej pracy postanowiono dokładnie określić wewnętrzną strukturę populacji gronkowców tej grupy w oparciu o właściwości genotypowe i fenotypowe.

1.1. Klasyfikacja gatunku *Staphylococcus aureus*

W 1880 roku szkocki badacz Ogston wyizolował z ropy pobranej od ludzi ziarniaki, tworzące nieregularne skupiska i zaproponował dla nich nazwę *staphylococcus* – gronkowce (grec. *staphyl* – grona). Rodzaj *Staphylococcus* został zaliczony wówczas do rodziny *Coccaceae* [156].

Klasyfikację gatunkową rodzaju *Staphylococcus*, jako pierwszy podał Rosenbach, który opierając się na barwie kolonii wyróżnił dwa gatunki: gronkowce tworzące pomarańczowożółte kolonie określił jako *Staphylococcus pyogenes aureus*, a gronkowcom o białej barwie kolonii nadał nazwę *Staphylococcus pyogenes albus* [182]. Nieco później, Passet dodał nowy gatunek - *Staphylococcus pyogenes citreus* - tworzący kolonie cytrynowe [165]. W następnych latach zrezygnowano z barwy kolonii jako cechy różniującej gatunki rodzaju *Staphylococcus*. Okazało się bowiem, że wytwarzanie barwnika nie może być przyjęte jako jedyne kryterium klasyfikacji gatunkowej bakterii, ze względu na niestabilność genetyczną tej cechy [1].

W 1903 roku Loeb wykrył zdolność wykrzepiania plazmy przez niektóre szczepy gronkowców [123]. Początkowo właściwość tą wiązano ze szczepami „złocistymi”, jednak później wykazano, że liczne szczepy „białe” także powodują wspomniane wyżej zmiany. Zdolność do wytwarzania koagulazy, ze względu na jej stabilność, została uwzględniona wśród cech identyfikacyjnych gronkowców w VII wydaniu klucza Bergey’a i traktowana była nie tylko jako wyznacznik służący do identyfikacji chorobotwórczych *S. aureus*, ale i podstawowy czynnik ich patogenności [52]. W rodzaju *Staphylococcus* wyodrębniono tylko dwa gatunki: *S. aureus*, który posiadał zdolność wytwarzania koagulazy i koagulazoujemny *S. epidermidis* [52]. Próba na koagulazę została powszechnie przyjęta, gdyż była łatwa do przeprowadzenia i miała znaczenie kliniczne - pozwalała bowiem, na odróżnienie szczepów chorobotwórczych od niechorobotwórczych. Pogląd, że koagulazododatnie szczepy *S. aureus* są jedynym gatunkiem chorobotwórczym, a koagulazoujemne – określane jako *S. epidermidis* – są raczej nieszkodliwymi komensalami skóry, utrzymywał się przez wiele lat i przyczynił się do pomijania tych ostatnich jako ewentualnego czynnika etiologicznego zakażeń [48, 52].

Baird-Parker uznając podział gronkowców na koagulazododatnie i koagulazoujemne za zbyt uproszczony, zaproponował w 1963 roku wyróżnienie w obrębie rodzaju *Staphylococcus* 6. podgrup. Podstawę tego podziału stanowiły: próby na koagulazę i fosfatazę,

tlenowa i beztlenowa fermentacja glukozy, fermentacja mannitolu, laktozy, maltozy i arabinozy. Do pierwszej podgrupy zostały zaliczone gronkowce koagulazo-dodatnie, z jednym gatunkiem *S. aureus*. Klasyfikacja Baird-Parkera stała się na przestrzeni kilku lat podstawą do dalszych badań nad gronkowcami [9].

W latach 70. zaczęto wykorzystywać w taksonomii skład zasad DNA oraz budowę ściany komórkowej bakterii. Pozwoliło to na wyodrębnienie nowych gatunków w rodzaju *Staphylococcus* [95, 189]. Posługując się tymi dodatkowymi kryteriami Kloos i Schleifer oraz ich współpracownicy dokonali kolejnych zmian w klasyfikacji rodzaju *Staphylococcus*. W wyniku ich badań w obrębie rodzaju *Staphylococcus* wyróżniono 19 gatunków [93, 190]. Zwiększenie liczby gatunków dotyczyło przede wszystkim gronkowców, które nie wytwarzały koagulazy. Jednocześnie obok koagulazododatniego *Staphylococcus aureus*, pojawił się nowy gatunek *Staphylococcus intermedius*, mający również zdolność wykrzepiania osocza, ale występujący u zwierząt [67]. Obecnie znanych jest ponad 40 gatunków w obrębie rodzaju *Staphylococcus*, ale gronkowiec złocisty pozostał nadal jedynym, izolowanym od ludzi, który posiada zdolność wytwarzania koagulazy.

1.2. Szczepy ludzkie i zwierzęce gronkowców złocistych

Koagulazododatnie gronkowce były przez wiele lat traktowane jako homogenna grupa, a określenia szczepy ludzkie i zwierzęce używano jedynie do wskazania źródła z którego pochodził izolat. Do podjęcia badań nad określeniem właściwości przydatnych do identyfikacji gronkowców zwierzęcych przyczyniło się zagrożenie skażenia nimi produktów żywnościowych a także występowanie zakażeń odzwierzęcych. W wyniku przeprowadzonych badań okazało się, że gronkowce koagulazododatnie mogą różnić się cechami biochemicznymi w zależności od gospodarza [64, 127].

Już w połowie XX wieku badania wykazały, że prawie wszystkie koagulazododatnie gronkowce izolowane od ludzi produkują fibrynolizynę, podczas gdy taką właściwość posiadają tylko nieliczne szczepy pochodzące od zwierząt [47, 64, 66, 122]. Jednocześnie zauważono, badając szczepy izolowane od bydła, że większość z nich wytwarza hemolizynę β i uznano powyższą właściwość za charakterystyczną dla szczepów bydlęcych. Podobne spostrzeżenia dotyczyły gronkowców pochodzących od innych gatunków zwierząt [47, 64].

W 1966 roku Meyer, opierając się na badaniach gronkowców izolowanych z ropy od ludzi oraz z mleka krowiego, zaproponował podział *Staphylococcus aureus* na 2 biotypy: *S. aureus var hominis* i *S. aureus var bovis*. Później, jako pierwszy, opisał trzeci biotyp: *S. aureus var canis*. Podział zaproponowany przez Meyera opierał się na właściwościach fenotypowych, w tym: produkcji fibrynolizyny, rodzaju wytwarzanych hemolizyn, typie wzrostu na podłożu agarowym z fioletem krystalicznym, wykrzepianiu plazmy ludzkiej i bydlęcej oraz wrażliwości na faga 42D [133, 134].

Szczepy *S. aureus var hominis* w odróżnieniu od pozostałych (*bovis* i *canis*) wydzielają fibrynolizynę i hemolizynę α , wykrzepiały plazmę ludzką a nie reagowały z bydlęcą, wytwarzały żółtopomarańczowe kolonie, wykazywały ujemny test z fioletem krystalicznym oraz nie były wrażliwe na faga 42D [133].

W latach 70. ukazywały się liczne prace poświęcone charakterystyce gronkowców izolowanych od zwierząt i mające na celu ustalenie doskonalszych kryteriów przydat-

nych do różnicowania szczepów *S. aureus* w zależności od gospodarza [99]. Badane były gronkowce złociste pochodzące od psów [154], od bydła [171] i innych zwierząt [51, 109]. Wyniki badań z tego okresu wykazały, że jest możliwe odróżnienie szczepów pochodzących od ludzi i zwierząt na podstawie wrażliwości na fagi, różnic w składzie ściany komórkowej, koagulacji plazmy ludzkiej czy bydlęcej, wytwarzania hemolizyn, a przede wszystkim fibrynolizyny.

Wykorzystując te spostrzeżenia Hájek i Maršálek zaproponowali ogólny schemat podziału gatunku *Staphylococcus aureus* na 6 biotypów [64, 127]. Pierwszy stanowiły szczepy ludzkie (biotyp A), natomiast pozostałe (biotypy B, C, D, E, F) – gronkowce zwierzęce. Biotyp B obejmował szczepy od drobiu i świń, biotyp C – od krów i owiec, biotyp D – od zajęcy, biotyp E – od psów, koni i norek oraz biotyp F – od gołębi. W przedstawionej klasyfikacji autorzy wzięli pod uwagę wytwarzanie fibrynolizyny, aktywność koagulazy wobec ludzkiej i bydlęcej plazmy, wydzielanie hemolizyn α i β oraz typ reakcji z fioletem krystalicznym i rodzaj pigmentu. Jako cechę różnicującą wykorzystali również wrażliwość na bakteriofagi [64, 127].

Późniejsze badania ujawniły znaczne różnice fenotypowe pomiędzy *S. aureus* izolowanymi od psów i gołębi (biotyp E i F) a pozostałymi szczepami *S. aureus*. Różnice te były na tyle znaczące, że szczepy biotypu E i F uznano za nowy gatunek – *Staphylococcus intermedius*. Szczepy zaliczane do wymienionego gatunku posiadały fenotypowe właściwości *S. aureus*, ale także ujawniały niektóre cechy *S. epidermidis*. Należały do nich: powolna fermentacja mannitolu, brak wytwarzania acetoiny i dodatnia reakcja na wytwarzanie β -galaktozydazy [67].

W latach 80. Devriese zaproponował schemat różnicowania gronkowców złocistych izolowanych od ludzi i zwierząt oparty na czterech testach biochemicznych (wytwarzanie fibrynolizyny, hemolizyny β , ścinanie plazmy bydlęcej i typ wzrostu na podłożu z fioletem krystalicznym) oraz typowaniu bakteriofagowym [41, 42]. Wyróżnił on 4 biotypy: ludzki, bydlęcy, owczy i drobiowy. Część szczepów została włączona do grupy określonej jako niecharakterystycznej dla żadnego gospodarza i oznaczona skrótem „NHS”. Szczepy te miały cechy, które nie odpowiadały właściwościom gronkowców żadnego z czterech wyróżnionych biotypów. Przedstawiona klasyfikacja nie obejmuje grupy gronkowców opisanej w późniejszych badaniach przez Isigidi i Devriese [79]. Szczepy tej grupy miały cechy biotypu drobiowego, lecz różniły się od niego wytwarzaniem białka A i zostały określone przez wyżej wymienionych autorów jako biotyp P-like pA⁺. Występowały one w produktach mięsnych a także u nosicieli wśród pracowników rzeźni i przetwórstwa mięsnego [79]. Biotyp P-like pA⁺ stanowił od 45% do 48% szczepów *S. aureus* izolowanych z mielonego mięsa wołowego i wieprzowego oraz od nosicieli – rzeźników bydła, trzody chlewnej i drobiu. U osób, które nie miały zawodowego kontaktu z mięsem oraz w grupie studentów weterynarii rzadko izolowano takie szczepy (8%). Typowanie bakteriofagowe szczepów P-like pA⁺ ujawniło ich częstą wrażliwość na fagi II grupy bakteriofagowej [79].

Podstawową właściwością odróżniającą szczepy ludzkie od zwierzęcych, jak wcześniej wspomniano, jest zdolność wytwarzania fibrynolizyny [41, 79, 127, 218]. Czynnikiem ten, nazywany inaczej stafylokinazą, rozpuszcza włóknik przez aktywację plazminogenu do aktywnego enzymu – plazminy [8]. Struktura fibrynolizyny przypomina proteazę serynową i dlatego pierwotnie została nazwana gronkowcową, obojętną proteazą III mimo, że nie posiada ona enzymatycznych właściwości [19]. Fibrynolizyna łączy się z plazminogenem w stosunku 1 : 1 w kompleks, który zmienia konformację tego drugiego czynnika i umożliwia jego aktywację. Fibrynolizyna jest białkiem o wielkości 15,5 kDa.

W jej strukturze trzeciorzędowej można wyróżnić α -helisę zawierającą region głównego oddziaływania fibrynolizyny z plazminogenem. Mutacje w tym regionie powodują prawie całkowitą utratę zdolności fibrynolizyny do aktywacji plazminogenu [19].

Fibrynolizyna jest produkowana przez lizogenne szczepy *Staphylococcus aureus*. Gen fibrynolizyny (*sak*) obecny jest w DNA bakteriofaga i może być przeniesiony do genomu bakterii. Nośnikami genów fibrynolizyny są bakteriofagi serotypu F (ph13, ph42D) oraz B (pH ϕ C). Przeniesienie genu *sak* zachodzące przy udziale bakteriofagów ph13, ph42D powoduje produkcję fibrynolizyny i jednocześnie wiąże się z hamowaniem wytwarzania β -hemolizyny na skutek insercyjnej inaktywacji [221]. Inaczej jest z bakteriofagiem pH ϕ C, który wbudowując się do genomu bakterii nie hamuje ekspresji β -hemolizyny [19]. Wytwarzanie fibrynolizyny zachodzi w końcowej fazie logarytmicznego wzrostu hodowli gronkowców. Odpowiedzialny za ten proces jest gen *sak* którego ekspresję kontroluje system regulatorowy *agr* [151]. Wpływ innych systemów regulacyjnych (*dlt*, *sar*) na produkcję fibrynolizyny sugerują inni autorzy [168].

Rola fibrynolizyny jako czynnika wirulencji była tematem wielu badań. Według jednych autorów, działanie fibrynolizyny ułatwia wnikanie gronkowców wgłąb tkanek [19, 28, 143]. Uważają oni, że w procesie adherencji gronkowców do komórek gospodarza, plazmina – utworzona dzięki połączeniu fibrynolizyny i plazminogenu – rozkłada białka zewnątrzkomórkowego matrix oznaczane skrótem MSCRAMM. Dodatkowo, plazmina, może rozpuszczać fibrynę wokół zainfekowanego ogniska lub ropnia pozwalając gronkowcom na zaatakowanie głębszych warstw tkanek [28, 143]. Bierze ona udział w chronieniu przed bakteriobójczym działaniem ludzkich α -defensyn (HNP-1, HNP-2) i przed obsonizacją (immunoglobulin G i C3b/C3bi). Powyższe właściwości fibrynolizyny mogą więc sprzyjać rozwojowi zakażeń inwazyjnych [19, 87, 177, 178]. Według innych badaczy, częstość występowania szczepów fibrynolizynododatnich jest wyższa w przypadkach niepowikłanej bakteriemii i u nosicieli, co wskazuje, że czynnik ten jest jednym z adaptacyjnych mechanizmów symbiozy *S. aureus* z gospodarzem a wytwarzaniem fibrynolizyny cechują się raczej szczepy o niższej chorobotwórczości. [19, 87, 218].

1.3. Metody różnicowania szczepów *S.aureus* w badaniach epidemiologicznych

Walka z zakażeniami wywołanymi przez gronkowce, ze względu na rozpowszechnienie tych drobnoustrojów wśród ludzi, zwierząt i otaczającego je środowiska, wymaga przeprowadzenia dochodzenia epidemiologicznego opartego na dokładnej charakterystyce szczepu. Spośród wielu metod, które można zastosować do różnicowania szczepów gronkowców izolowanych od ludzi, najczęściej w ubiegłych latach wykorzystywane było typowanie bakteriofagowe. Metoda ta przyczyniła się do dokładnego poznania epidemiologii zakażeń gronkowcowych [9, 162, 175]. Obecnie miejsce typowania bakteriofagowego coraz częściej zajmuje typowanie genetyczne [70, 129, 130, 195]. Zastosowanie metod genetycznych w epidemiologii zakażeń gronkowcowych umożliwia nie tylko zróżnicowanie szczepów, lecz także analizę stopnia pokrewieństwa między nimi prowadzącą do wyodrębnienia klonów i kompleksów klonalnych w populacji gronkowców złocistych [106, 124, 126, 129, 130].

1.3.1. Metody fenotypowe

Najstarsze metody służące do różnicowania szczepów *S. aureus* w dochodzeniu epidemiologicznym zostały opracowane na podstawie wyników oznaczeń wybranych cech fenotypowych [9, 135, 146, 155]. Biotypowanie wykorzystuje różnice w aktywności enzymatycznej bakterii wobec określonych substratów, w wytwarzaniu białek strukturalnych (białko A), produkcji toksyn, typach wzrostu na podłożu z fioletem krystalicznym, oporności na sole metali ciężkich i jest wykorzystywane do różnicowania zarówno szczepów MRSA jak też MSSA [3, 146, 149]. Do odróżnienia szczepów ludzkich od zwierzęcych stosuje się biotypowanie oparte na wykorzystaniu czterech właściwości: wytwarzania fibrylizyny, hemolizyny β , koagulowania plazmy bydlęcej, oraz typu wzrostu na agarze z fioletem krystalicznym [41]. Z czasem, dzięki technikom elektroforetycznym i metodzie immunoblottingu, zaczęto wykorzystywać w typowaniu bakterii analizę wszystkich białek komórkowych [15, 36, 99]. Inną klasyczną metodą typowania gronkowców złocistych jest analiza wzorów lekooporności [153, 199]. Ich ustalenie jest pierwszym etapem analizy epidemiologicznej i posiada szczególne znaczenie w praktyce klinicznej [74].

Wśród metod fenotypowych bardzo ważne miejsce zajmuje typowanie bakteriofagowe gronkowców złocistych.

1.3.1.1. Typowanie bakteriofagowe

Metoda typowania bakteriofagowego gronkowców złocistych jako sposób dokładnej identyfikacji szczepu w badaniach epidemiologicznych została po raz pierwszy zaproponowana przez Fiska w 1942 roku [56]. Namnażał on bakteriofagi w lizogenicznych szczepach *Staphylococcus aureus*, opierając się na technice krzyżowych posiewów. Stwierdzona przez niego wybiórcza aktywność fagów wobec szczepów bakteryjnych pozwoliła zróżnicować gronkowce złociste w obrębie gatunku [56]. Metoda typowania bakteriofagowego była później udoskonalana i standaryzowana przez różnych badaczy. W 1945 roku Wilson i Atkinson do różnicowania gronkowców złocistych opracowali zestaw 18. fagów podzielonych na 3 grupy lityczne [220]. Istotnym elementem standaryzującym metodę typowania było wprowadzenie pojęcia określającego aktywność preparatów bakteriofagowych – *Routine Test Dilution* (RTD). Stosowanie do badań wzorcowych fagów w określonych stężeniach RTD dało możliwość uzyskiwania porównywalnych wyników w poszczególnych ośrodkach [220]. Dalszą standaryzacją techniki typowania bakteriofagowego zajął się powołany w 1953 roku Podkomitet Typowania Bakteriofagowego Gronkowców, który określił kryteria, według których zestaw fagów mógłby być stosowany do typowania gronkowców złocistych jako międzynarodowy standard. W wyniku działania podkomitetu został zatwierdzony podstawowy zestaw składający się z następujących fagów: I grupa – 29, 52, 52A, 79; II grupa – 3A, 3B, 3C, 55; III grupa – 6, 7, 42E, 47, 53, 54, 70, 73, 75, 77; IV grupa – 42D [162].

W kolejnych latach pewnym modyfikacjom ulegały zarówno kryteria przyjęte w technice typowania bakteriofagowego, jak też skład podstawowego zestawu fagów. Podyktowane to było potrzebą eliminacji fagów działających na zbyt małą lub zbyt dużą liczbę szczepów. Przydatność takich fagów w badaniach epidemiologicznych była ograniczona, co zmuszało do poszukiwania nowych. Obowiązujący obecnie podstawowy

zestaw zawiera 23 bakteriofagi wśród których znalazło się czternaście z dziewiętnastu fagów zatwierdzonych w roku 1953 i dziewięć włączonych w kolejnych latach [162].

1.3.2. *Typowanie genetyczne*

Duże zainteresowanie genetyką w latach 90. XX wieku zaowocowało szybkim rozwojem metod opartych na badaniu bakteryjnego DNA. Ze względu na ich wysoką siłę różnicującą i powtarzalność wyników a także fakt, że różnicowały niemal wszystkie szczepy, zaczęto coraz częściej wykorzystywać je do różnicowania drobnoustrojów i analizy stopnia pokrewieństwa między nimi [126, 129, 130, 202, 207, 208].

Szerokie zastosowanie w typowaniu gronkowców złocistych znalazła analiza polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych genomowego DNA przy użyciu elektroforezy w zmiennym polu elektrycznym (PFGE). [44]. Stworzyła ona możliwości analizy wzorów trawionego przez enzymy restrykcyjne chromosomalnego DNA. Otrzymany wzór prążków jest charakterystyczny dla szczepu i aby określić pokrewieństwo między izolatami wykorzystuje się do tego celu interpretację przyjętą przez Tenovera i wsp. [208]. Metoda PFGE posiada dużą siłę różnicującą i jest szczególnie przydatna w badaniach nad klonalnym rozprzestrzenieniem szczepów *S. aureus* [21, 44, 193, 208]. Z badań Bannerman i wsp. wynika, że wspomniana metoda może zastąpić typowanie bakteriofagowe, gdyż wyniki uzyskane w typowaniu *S. aureus* przy wykorzystaniu obydwu metod są porównywalne, a szczepy wyróżnione w metodzie PFGE jako klon bakteryjny, w typowaniu bakteriofagowym mają określony fagotyp [11].

Metodą opartą na amplifikacji fragmentu gatunkowo swoistego genu i sekwencjonowaniu produktu reakcji PCR jest typowanie genu białka A (*spa*). Dzięki odpowiednio dobranym starterom, rozpoznającym sekwencje ograniczające zmienny region X genu *spa*, przeprowadza się reakcję amplifikacji (PCR), w wyniku której otrzymany produkt jest następnie sekwencjonowany [68, 71, 195]. Fragment X genu *spa* odpowiada za przyczepienie białka A do ściany komórkowej i zawiera zmienną liczbę krótkich sekwencji powtórzonych (SSR) o długości 21-24 nukleotydów [195]. Ich powstanie związane jest ze spontanicznymi mutacjami punktowymi, duplikacjami czy też delecjami powtórzeń w procesie ewolucji populacji gronkowców [59, 195]. Otrzymane w wyniku sekwencjonowania powtórzenia są kolejno numerowane i opracowywane przy zastosowaniu programu Ridom Spa Type (<http://spaserver.ridom.de>). Wynik podawany jest w postaci kodu numerycznego, oznaczającego typy *spa* wraz z informacjami o kolejności i zmianach w regionach powtarzanych [70]. Zastosowanie algorytmu BURP dostępnego w programie RidomStaphType software/Demo, stwarza możliwości pogrupowania typów *spa* w kompleksy klonalne (*spa*-CC) [129, 130].

Metoda MLST określa sekwencje nukleotydów kilku genów w genomie bakteryjnym. Polega ona na sekwencjonowaniu fragmentów siedmiu genów niezbędnych w utrzymaniu metabolizmu komórkowego (*housekeeping genes*). Różne odmiany sekwencji tych genów odczytywane są jako różne allele i tworzą one typ sekwencji charakterystyczny dla danego izolatu. Dzięki utworzeniu międzynarodowej bazy danych MLST dla *S. aureus* izolatów przypisywany jest profil alleliczny, co umożliwia porównanie izolatów z innych krajów [34, 49, 125, 126, 187].

Rozwój biologii molekularnej stwarza nowe możliwości doskonalenia metod typowania szczepów *S. aureus*. Obecnie, na bazie już istniejących metod, tworzone są nowe

ich odmiany [33, 98, 206]. Możliwości wyboru odpowiedniej metody są duże, jednak ich dostępność i koszty z nimi związane mogą być w niektórych przypadkach ograniczeniem ich zastosowania.

1.4. Ewolucja fagotypów gronkowców złocistych

Przed okresem stosowania sulfonamidów większość zakażeń szpitalnych była wywoływana przez paciorkowce i maczugowce błonicy. Wprowadzenie do lecznictwa w latach 40. XX wieku sulfonamidów a następnie penicyliny, na które wymienione bakterie były wrażliwe, spowodowało wzrost zakażeń gronkowcami ze względu na pojawienie się wśród nich szczepów opornych na te leki [13, 184]. Przed erą stosowania penicyliny, gronkowce posiadały niewielką, naturalną oporność na ten lek, co wykazały badania retrospektywne kolekcji szczepów pochodzących z lat 20. i 30. Doniesienia o szczepach penicylinoopornych zaczęły pojawiać się tuż po wprowadzeniu tego antybiotyku do leczenia [13]. Od tego czasu gronkowce złociste stały się jednym z najważniejszych czynników zakażeń szpitalnych.

Widoczny postęp w badaniach nad zakażeniami gronkowcowymi nastąpił po wprowadzeniu przez Fiska w 1942 roku typowania bakteriofagowego [56]. Metoda ta stała się podstawowym narzędziem różnicowania w badaniu epidemiologicznym szczepów. Obserwacje prowadzone od lat 50. wykazały, że gronkowce złociste izolowane ze środowisk szpitalnych typowały się głównie fagami I i III grupy, podczas gdy w środowiskach poza szpitalnych dominowały szczepy II grupy fagowej [81, 83].

Jak już wcześniej wspomniano, w latach 50. w wielu krajach, epidemie szpitalne wywoływały gronkowce złociste o fagotypie 80/81. Z czasem pojawiły się szczepy o nowym wzorze fagowym 52/52A/80/81 i zbliżonym zakresie oporności na antybiotyki oraz podobnej chorobotwórczości jak szczepy 80/81 [103, 186]. Ostatecznie gronkowce złociste o wzorach 80/81 i 52/52A/80/81 zaliczono do jednego zespołu fagowego „52/52A/80/81” [162]. Należące do niego szczepy dominowały w szpitalach do połowy lat 60. i były na ogół odporne jedynie na penicylinę lub dodatkowo na streptomycynę. Późniejszy spadek częstości ich występowania – na rzecz wielolekoopornych gronkowców III grupy fagowej – prawdopodobnie związany był z wprowadzeniem do leczenia nowych antybiotyków [83, 100].

Występowanie wśród gronkowców złocistych dominującej w kolejnych latach III grupy fagowej zaobserwowano po raz pierwszy w szpitalach Wielkiej Brytanii w 1958 roku [162]. W porównaniu z zespołem „52/52A/80/81” miały one mniejszą tendencję do rozprzestrzeniania się w szpitalach, a zwłaszcza do powodowania zakażeń poprzez nie-naruszoną skórę; były jednak przyczyną poważnych zakażeń u pacjentów poddanych zabiegom chirurgicznym [162]. Pierwsze szczepy okazały się wrażliwe na faga 83A i dawały reakcje inhibicji z innymi fagami III grupy [86]. W Wielkiej Brytanii częstość epidemii szpitalnych spowodowanych przez nie sięgała od 8% do 12% [85]. W kilka lat później, pojawiły się szczepy wrażliwe na fagi 84 i 85 [198]. Oprócz oporności na penicylinę, streptomycynę i tetracyklinę, wykazywały one nie spotykaną dotąd oporność na neomycynę i często na bacytracynę. Przypuszcza się, że szczepy te rozprzestrzeniały się w środowisku szpitalnym nie ze względu na swoją zjadliwość, lecz oporność na wiele antybiotyków [86, 136, 198].

Pod koniec lat 60. i na początku 70. zaznaczył się stopniowy spadek częstości występowania fagotypów III grupy fagowej, co wiązało się prawdopodobnie ze znacznym polepszeniem higieny szpitalnej, ograniczającej możliwość szerzenia się zakażeń szpitalnych oraz z wprowadzaniem do leczenia nowych antybiotyków [24, 83].

Znaczenie gronkowców złocistych jako czynnika etiologicznego zakażeń szpitalnych ponownie wzrosło po pojawieniu się szczepów opornych na metycylinę (MRSA), które do dnia dzisiejszego stanowią w środowisku szpitalnym poważny problem epidemiologiczny i terapeutyczny [22, 24, 38].

Pierwsze doniesienia dotyczące występowania szczepów MRSA pojawiły się na początku lat 60. w Wielkiej Brytanii [84, 94]. Początkowo miały one ograniczony zasięg i były oporne z reguły tylko na antybiotyki β -laktamowe [22]. Od połowy lat 70. zaczęły się jednak pojawiać doniesienia o zakażeniach szpitalnych spowodowanych szczepami MRSA opornymi nie tylko na antybiotyki β -laktamowe, ale także na inne leki [38]. Wkrótce doszło do rozprzestrzenienia się wieloopornych szczepów MRSA w środowisku szpitalnym, czemu sprzyjały coraz powszechniej stosowane inwazyjne metody leczenia [22, 167]. Już w pierwszych doniesieniach o szczepach MRSA, niektóre cechy fenotypowe wskazywały na klonalny charakter wywołanych przez nie zakażeń. Z zakażeń tych izolowano bowiem szczepy o identycznych wzorach fagowych i wzorach oporności na antybiotyki. Na przełomie lat 70. i 80. pojawiły się opisy szpitalnych epidemii obejmujących swym zasięgiem wiele szpitali na dużych obszarach geograficznych wywołanych przez jeden szczep MRSA [161, 209, 210]. Badania nad podobieństwem między izolowanymi na różnych kontynentach szczepami MRSA pozwoliły na sformułowanie tezy o klonalnym rozprzestrzenieniu się jednego, epidemicznego szczepu [210]. W Wielkiej Brytanii opisano na przykład 17 epidemicznych klonów oznaczonych jako EMRSA [140, 158]. Niektóre z nich mają międzynarodowy charakter ze względu na swój zasięg [106, 157].

1.5. Rola gronkowców złocistych II grupy fagowej w zakażeniach u hospitalizowanych pacjentów

Jak wynika z przytoczonych danych szczepy II grupy bakteriofagowej nigdy wcześniej nie miały zasadniczego znaczenia w zakażeniach szpitalnych, co prawdopodobnie wiąże się z ich większą niż u innych gronkowców wrażliwością na antybiotyki. Na początku lat 80. zaobserwowano jednak wzrost częstości występowania gronkowców II grupy fagowej w środowisku szpitalnym.

Eriksen, przeprowadzając badania retrospektywne obejmujące okres 1961–1991 za- uważał, że częstość izolacji gronkowców II grupy fagowej w duńskich szpitalach wzrosła z 16% w 1983 roku do około 23% w 1991 roku [50]. Według Rosdahl i wsp. częstość występowania gronkowców wspomnianej grupy w szpitalach i środowisku pozaszpitalnym występowała w tym okresie na tym samym poziomie [180]. Jednocześnie zauważono coraz częstsze występowanie szczepów II grupy bakteriofagowej w zakażeniach krwi i wykazano, że śmiertelność wśród takich pacjentów była podobna jak w przypadku zakażeń wywołanych przez inne szczepy gronkowców złocistych [53].

Na wzrastające znaczenie grupy II wśród hospitalizowanych pacjentów zwrócono uwagę również w naszym kraju. Kryński i wsp. w materiale zebranym na początku lat 80. wykazali, że częstość występowania gronkowców II grupy bakteriofagowej była

wyższa, aniżeli stwierdzona w badaniach z lat 60. i 70. i wynosiła 16,4% [105]. Według Galińskiego, wśród gronkowców izolowanych od hospitalizowanych pacjentów w latach 80. wartości te były wyższe i wynosiły od 24,4% do 28,7% [61]. Badania pochodzące z ostatnich kilku lat dowiodły, że częstość izolowania szczepów II grupy u hospitalizowanych pacjentów utrzymuje się nadal na poziomie z lat 80. i wynosi od 23,6% do 26,5% [107, 170].

Wraz ze wzrostem częstości występowania szczepów II grupy w szpitalach, odnotowano również wzrost zakresu ich oporności na antybiotyki. Przeprowadzone przez Eriksen'a i wsp. badania nad lekoopornością szczepów *S. aureus* wykazały, że od roku 1961 do początku lat 90. częstość występowania gronkowców II grupy bakteriofagowej opornych na penicylinę wzrosła z około 60% do ponad 90%. Wprawdzie wzrost oporności na ten antybiotyk odnotowano w tym okresie również wśród szczepów szpitalnych należących do innych grup fagowych, lecz był on prawie 2-krotnie niższy [50]. Według opinii różnych autorów, tak wysoka oporność szczepów II grupy fagowej na penicylinę mogła być wynikiem nabycia przez nie plazmidu penicylinazowego (21 kb) z genem *blaZ* i tym samym zwiększenia ilości wytwarzanej β – laktamazy typu C lub działania chromosomalnego genu *blaZ*, kodującego typ B penicylinazy [197]. Podobna sytuacja dotyczyła oporności na tetracykliny. Od początku lat 60. do lat 90. wzrósł odsetek szczepów II grupy fagowej opornych na tetracykliny z 4,5% do prawie 10%, podczas gdy wśród gronkowców złocistych reprezentujących pozostałe grupy fagowe tetracyklinooporne szczepy zmniejszyły częstość występowania z ponad 18% do 4,7% [50, 181]. Na podstawie przytoczonych danych można więc stwierdzić, że na przestrzeni 30 lat wśród gronkowców II grupy fagowej znacznie wzrosła liczba szczepów opornych na penicylinę i tetracykliny, jednak niewrażliwość na pozostałe leki stosowane w leczeniu była na ogół niższa niż pozostałych grup fagowych [50, 53].

Zdania, co do częstości występowania szczepów II grupy bakteriofagowej wśród pacjentów z różnych oddziałów szpitalnych, są podzielone. Według jednych autorów gronkowce te występują głównie w oddziałach noworodkowych i oparzeniowych [17, 180, 181, 222], według innych – w oddziałach intensywnej opieki medycznej [224]. Można je również znaleźć u nosicieli wśród personelu medycznego z różnych oddziałów szpitalnych. Pod względem częstości występowania, nosicielstwo gronkowców tej grupy wśród personelu medycznego jest podobne jak w pozostałych grupach fagowych [51, 215].

Gronkowce II grupy fagowej wywołują różne schorzenia charakterystyczne dla gatunku *Staphylococcus aureus*. Wyróżnia je jednak zdolność do wywoływania zakażeń skóry takich jak: liszajec zakaźny czy zespół oparzonej skóry, uwarunkowanych wytwarzaniem specyficznych toksyn zwanych eksfoliatyną A i B [2, 5, 90, 111, 112, 132]. Eksfoliatyny, mimo różnic serologicznych, mają zbliżoną aktywność biologiczną. Uszkadzają one warstwę ziarnistą naskórka, powodując złuszczenie powierzchniowych warstw skóry [5, 69, 96, 97, 223]. Wieloletnie obserwacje przypadków występowania zespołu oparzonej skóry wykazały, że dotyczą najczęściej noworodków i małych dzieci [111]. Stosunkowo niedawno wykryto substrat dla eksfoliatyn, którym jest występująca jedynie w skórze młodych ssaków desmogleina – 1 [4]. Fakt ten jest główną przyczyną wrażliwości dzieci na epidermolityczne działanie eksfoliatyn.

2. CEL PRACY

Gronkowce złociste mogą wywoływać zakażenia zarówno u ludzi jak i u zwierząt [43, 45, 89, 139, 142, 217]. Można wśród nich wyróżnić biotypy, które charakteryzują szczepy ludzkie i zwierzęce, izolowane od różnych gatunków zwierząt [65, 67].

W latach 90. Isigidi i Devriese opisał nowy biotyp P-like pA+, który najczęściej występował w produktach mięsnych i u osób zawodowo związanych z ich produkcją [79]. Cechą wymienionego biotypu – w odróżnieniu od szczepów ludzkich – jest brak wytwarzania fibrynolizyny [79]. Jak dotąd pochodzenie szczepów biotypu P-like pA+ nie zostało określone.

Badając gronkowce złociste pochodzące zarówno od pacjentów szpitalnych jak i osób spoza środowiska szpitalnego, zgromadzone w kolekcji Zakładu Mikrobiologii GUMed, zwrócono uwagę na częste występowanie szczepów fibrynolizynoujemnych w II grupie bakteriofagowej. Fakt ten wydał się bardzo interesujący, ponieważ mógłby wskazywać na pewne powiązania tej grupy z gronkowcami pochodzącymi od zwierząt i sugerować przenikanie szczepów *Staphylococcus aureus* ze środowiska zwierzęcego do ludzkiego.

Celem obecnej pracy było więc zbadanie:

1. czy szczepy fibrynolizynoujemne różnią się od pozostałych gronkowców złocistych II grupy bakteriofagowej pod względem cech genetycznych i fenotypowych poprzez:
 - określenie biotypów
 - przeprowadzenie typowania genetycznego w celu zbadania struktury klonalnej populacji szczepów II grupy fagowej
 - określenie potencjału chorobotwórczego
 - określenie wrażliwości na fagi i zbadanie profilu oporności na antybiotyki
2. czy fibrynolizynoujemne gronkowce złociste II grupy bakteriofagowej są spokrewnione ze szczepami zwierzęcymi?

3. MATERIAŁ I METODY

3.1. Pochodzenie badanych szczepów

3.1.1. *Szczepy S.aureus II grupy bakteriofagowej izolowane od ludzi*

W celu wyodrębnienia gronkowców należących do II grupy bakteriofagowej przebadano 445 izolatów *Staphylococcus aureus* wyizolowanych w okresie od maja do grudnia 2004 roku. Uzyskano je od osób chorych i każdy izolat pochodził od innego pacjenta. Szczepy zostały wyhodowane w laboratoriach mikrobiologicznych klinik i szpitali, skąd przesłano je do Ośrodka Typowania *Staphylococcus aureus* Bakteriofagami w Gdańsku w celu przeprowadzenia badania podstawowym zestawem 23 fagów.

Do dalszych badań zakwalifikowano grupę 112 szczepów *S. aureus* wrażliwych na fagi II grupy bakteriofagowej. Gronkowce pochodziły głównie od pacjentów leczonych w gdańskich szpitalach i w innych szpitalach na terenie województwa pomorskiego (tabela 1). Były to:

- Wojewódzki Szpital Zakaźny (GDA1),
- Szpital Ministerstwa Spraw Wewnętrznych (GDA2),
- Państwowy Szpital Kliniczny nr 1 (GDA3),
- Szpital Specjalistyczny im. św. Wojciecha Alberta (GDA4),
- Specjalistyczny ZOZ nad Matką i Dzieckiem (GDA5),
- Szpital Marynarki Wojennej (GDA6) w Gdańsku,
- SP ZOZ Szpital w Lęborku (LEB),
- Wojewódzki Szpital Zespolony w Słupsku (SŁU).

Dwa ośrodki:

- Szpital Leczenia Oparzeń w Siemianowicach Śląskich (SIE),
- Instytut Surowic i Szczepionek w Krakowie (KRA) były położone na południu Polski, a szczepy *S. aureus* przysyłane do badań pochodziły z 1991 i 1999 roku.

Część izolatów *S. aureus* II grupy fagowej (n=29) pochodziła od osób zdrowych. Byli to studenci III roku Wydziału Lekarskiego oraz I roku Pielęgniarstwa Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Gronkowce złociste wyizolowano od nich w czasie badań na nosicielstwo (wymazy z nosa) prowadzonych w ramach zajęć z mikrobiologii (X 2004). Badanych studentów zaliczono do grupy osób bez klinicznego kontaktu z pacjentami ze względu na brak wcześniejszych praktyk klinicznych. Od każdego studenta pobrano jeden wymaz.

Badane gronkowce izolowano z różnych materiałów klinicznych (tabela 1).

Tabela 1. Pochodzenie badanych gronkowców II grupy bakteriofagowej
Table 1. Origin of staphylococci of phage group II used in this study

Pochodzenie <i>Origin</i>	Szpitale <i>Hospitals</i>										Środowisko pozaszpitalne <i>Community</i>	N
	GDA 1	GDA 2	GDA 3	GDA 4	GDA 5	GDA 6	LEB	SŁU	KRA	SIE		
pęcherzowe zapalenie skóry <i>scalded skin syndrome</i>	-	-	-	4	-	-	-	-	-	-	-	4
czyrak <i>furunculus</i>	1	1	10	1	-	-	-	1	-	-	-	14
inne zmiany skórne <i>other skin lesions</i>	1	-	-	-	-	-	1	1	5	-	-	8
rana <i>wound</i>	5	1	-	2	-	1	5	8	-	1	-	23
plwocina, treść oskrzeli <i>sputum, bronchial fluid</i>	1	2	-	2	2	-	4	2	-	-	-	13
krew <i>blood</i>	2	-	-	1	-	-	1	-	-	-	-	4
gardło <i>throat</i>	1	1		1	1		4	1	-	-	-	9
nos <i>nose</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	29	29
spojówka <i>conjunctiva</i>	-	1	-	-	1	-	1	-	-	-	-	3
odbyt <i>rectum</i>	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1
drogi rodne <i>genital tract</i>	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	2
przetoka <i>fistula</i>	-	1	-	-	-	1	-	-	-	-	-	2
razem / <i>total</i>	11	8	10	13	4	2	16	13	5	1	29	112

3.1.2. Szczepy *S. aureus* pochodzenia zwierzęcego

Badaniami objęto 22 izolaty *S. aureus* pochodzące z zakażeń od świń i drobiu. Przy wyborze kierowano się danymi literaturowymi, które mówią, że gronkowce izolowane od ludzi są najbardziej podobne do *S. aureus* pochodzących od tych zwierząt [60, 64, 67]. Szczepy od świń (n=15) były izolowane w kilku gospodarstwach hodowlanych, w okresie od lipca 2006 do lutego 2007 roku. Każdy izolat pochodził ze zmian skórnych od innego zwierzęcia. Opracowanie pobranego materiału wykonano w Zakładzie Higieny Weterynaryjnej w Łomży i dzięki uprzejmości dr. hab. Antoniego Jakubczaka wyizolowane szczepy udostępniono do badań.

Gronkowce złociste od drobiu (n=7) pochodziły ze zbiorów pani prof. Aliny Wieliczko z Zakładu Chorób Drobiu we Wrocławiu oraz od dr. hab. Jacka Międzobrodzkiego z Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie. Izolowano je z płynu stawowego (n=6) oraz z bioptatu wątroby (n=1). Każdy izolat pochodził od innego zwierzęcia.

3.2. Szczepy wzorcowe

Do badań wykorzystano następujące szczepy wzorcowe:

- oznaczanie lekooporności metodą dyfuzyjno-krażkową: *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC 29213 i *S. aureus* BM 52 (MRSA, IV klasa heterogenności) z Uniwersytetu Rockefellera w Nowym Yorku, dzięki uprzejmości dr. K. Trzcíńskiego
- oznaczanie poziomu białka A: *S. aureus* Cowan I (wysoki poziom białka A) i *S. aureus* Wood 46 (brak białka A) z Uniwersytetu w Bergen, od prof. P. Oedinga
- wykrywanie genów toksyn metodą PCR: *S. aureus* 14.003 (*eta*+, *etb*+), *S. aureus* 14.004 (*sea*+, *tst*+) z kolekcji Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego w Warszawie (Mikrobank) oraz szczepy *S. aureus* 490/02 (*sec*+, *sed*+), *S. aureus* 864/04 (*seb*+), *S. aureus* 179/04 (*lukS-PV/lukF-PV*+) ze zbiorów Zakładu Mikrobiologii GUMed.
- oznaczanie wytwarzania fibrynolizyny oraz wykrywanie genu fibrynolizyny (*sak*) metodą PCR: *S. aureus* Wood 46 (*sak*+)
- oznaczanie wytwarzania hemolizyny β : *S. aureus* ATCC 25923 (wytwarza β -hemolizynę).

3.3. Przechowywanie szczepów

Szczepy badane oraz szczepy wzorcowe przechowywano w temperaturze -70 °C na podłożu TSB (Difco, USA) z dodatkiem 10% glicerolu. Przygotowanie do zamrożenia obejmowało założenie hodowli na podłożu TSB (BioMerieux, Francja), a następnie inkubację przez noc w 37 °C. Po uzyskaniu wzrostu bakterii, do hodowli dodawano glicerolu do stężenia 10% i zamrażano. Szczepy pobierano z zamrożenia każdorazowo w celu przeprowadzenia serii badań. Szczepy używano do badań po dwukrotnym pasażo-

waniu na podłożu TSA (Difco, USA) z 5% krwią baranią (Graso, Polska). Hodowlę inkubowano przez 18 – 24 godziny w 37 °C w warunkach tlenowych.

3.4. Identyfikacja gatunku *Staphylococcus aureus*

Przynależność do gatunku *Staphylococcus aureus* ustalano na podstawie morfologii kolonii, morfologii komórki bakteryjnej, obecności czynnika CF i koagulazy oraz testu Api ID32 Staph (BioMerieux, Francja). Bakterie wyrosłe po 24 godzinach hodowli w 37 °C na podłożu TSA (Difco, USA) z dodatkiem 5% krwi baraniej (Graso, Polska) w postaci okrągłych, gładkich, wypukłych i błyszczących kolonii (1 – 3 mm średnicy) o barwie kremowożółtej, żółcistej lub pomarańczowej i jednocześnie posiadające komórki kształtu kulistego, barwiące się w metodzie Grama na kolor fioletowy, układające się w nieregularne skupienia przypominające grona, kwalifikowano do odczynu na obecność czynnika CF i koagulazy [12].

3.4.1. Odczyn na obecność czynnika CF

Odczyn CF wykonywano na 24-godzinnej hodowli gronkowców na podłożu TSA (Difco, USA) z 5% krwinkami baraniami (Graso, Polska) w temperaturze 37 °C. Na szkiełku podstawowym umieszczano dwie krople jałowego, fizjologicznego roztworu soli. W obydwu kroplach, przy pomocy ezy sporządzano gęstą zawiesinę bakterii, wyglądem przypominającą mleko. Do jednej z dwóch kropli zawiesiny – przy pomocy ezy – dodawano dużą kroplę osocza króliczego (Biomed, Kraków), następnie mieszano poprzez delikatne kołysanie szkiełkiem. Pojawienie się w ciągu 5 – 30 sekund zlepow komórek odczytywano jako wynik dodatni. Pozostanie jednorodnej zawiesiny odczytywano jako wynik ujemny [82]. W tym ostatnim wypadku, jak też wtedy, gdy szczep wykazywał autoaglutynację w fizjologicznym roztworze soli, badano obecność koagulazy metodą probówkową.

3.4.2. Test na koagulazę

Do badania używano 24-godzinnej hodowli szczepu w 37 °C na płynnym podłożu TSB (Difco, USA). W próbówce o średnicy 10 mm zawierającej 0,8 ml hodowli bakteryjnej dodano 0,2 ml osocza króliczego (Biomed, Kraków) rozcieńczonego 1:4 (v/v) w jałowym, fizjologicznym roztworze soli. Próbę inkubowano w 37 °C. Wynik odczytywano po 2, 4, 6 i 24 godzinach inkubacji. Pojawienie się wyraźnego skrzepu osocza odczytywano jako wynik dodatni [201].

3.4.3. Test Api ID32 Staph

Identyfikację gatunkową potwierdzano gotowym testem Api ID32 Staph (BioMerieux, Francja). Postępowano według zaleceń producenta. W tym celu, badane gronkowce hodowano na podłożu TSA (Difco, USA) z dodatkiem 5% krwi baraniej (Graso, Polska)

przez 18 godzin, po czym zawieszano w podłożu Api Staph Medium do uzyskania gęstości optycznej 0,5 w skali Mc Farlanda (2×10^8 CFU/ml). Gęstość zawiesiny określano nefelometrycznie, przy wykorzystaniu czytnika ATB 1550 (bioMerieux, Francja). 55 μ l zawiesiny bakteryjnej nanoszono do poszczególnych studzienek na pasku Api ID32 Staph. Zawierały one studzienki z testami na wytwarzanie: ureazy (URE), dihydrolazy argininy, dekarboksylazy ornityny (ODC), hydrolazy eskuliny (ESC), fermentację glukozy (GLU), fruktozy (FRU), mannozy (MNE), maltozy (MAL), laktozy (LAC), trehalozy (TRE), mannitolu (MAN), rafinozy (RAF), rybozy (RIB), celebiozy (CEL), redukcję azotanów (NIT), wytwarzanie acetony (VP), β -galaktozydazy (β GAL), arylamidazy argininy (ArgA), fosfatazy alkalicznej (PAL), arylamidazy pirolidonylu (PyrA), oporność na nowobiocynę (NOVO), fermentację sacharozy (SAC), N-acetyloglukozaminy (NAG), turanozy (TUR), arabinozy (ARA), wytwarzanie β -glukuronidazy (β GUR). Wyniki odczytywano po 18-godzinnej inkubacji w temperaturze 37 °C na czytniku elektronicznym ATB Expression, Vitek Systems (BioMerieux, Francja) sprzężonym z komputerem i obsługiwanym przez program komputerowy ATB PLUS. Część prób odczytywano po uprzednim dodaniu odczynników: NIT 1 i NIT 2 do próby NIT, odczynnika FB do próby β Gal, VPA i VPB do próby VP i odczekaniu 10 minut.

3.5. Typowanie bakteriofagowe

3.5.1. Namnażanie i miareczkowanie fagów

Szczepy homologiczne *Staphylococcus aureus* oraz podstawowy zestaw 23 bakteriofagów otrzymano z Central Public Health Laboratory w Londynie od prof. M. Marples'a.

Etap namnażania fagów przeprowadzono na 18-godzinnej hodowli szczepu homologicznego na podłożu TSA (Difco, USA) z 5% krwią baranią. Pobierano 2 – 3 kolonie i wsiewano je do 20 ml bulionu do namnażania fagów (2,5% pepton, 0,2% glukoza, 0,3% wyciąg wołowy, 0,5% NaCl, pH=7,4). Hodowlę prowadzono w temperaturze 37 °C w łaźni wodnej z wytrząsaniem, do czasu uzyskania zmętnienia równego gęstości 0,5 w skali Mc Farlanda (4 – 5 godzin). Hodowlę następnie zakażano zawiesiną faga (1,5 ml) i inkubowano w temperaturze 30 °C w łaźni wodnej z wytrząsaniem. Po upływie około 5 godzin kolbę umieszczano do sklarowania w temperaturze 4 °C. Następnego dnia klarowny lizat odpipetowywano do probówek, a w wypadku obecności zmętnienia, proces namnażania fagów powtarzano. Zakonserwowane tymolem lizaty przechowywano przez 2 – 3 tygodnie w temperaturze 4 °C.

W następnym etapie przeprowadzono miareczkowanie fagów w celu oznaczenia ich miana. Zawiesinę szczepu homologicznego w fizjologicznym roztworze soli (0,5 w skali Mc Farlanda) rozprowadzano równomiernie na powierzchni płytki z agarem fagowym (1% pepton, 0,1% glukoza, 0,3% wyciąg drożdżowy, 1,3% agar, 400 mg/l CaCl₂, pH=7,4). Płytkę suszono w temperaturze pokojowej i nanoszono na nią serię czterech dziesięciokrotnych rozcieńczeń zawiesiny faga w płynie Ringera w proporcjach: 1:10, 1:100, 1:1.000, 1:10.000, w ilości po 20 μ l. Płytkę pozostawiono do wyschnięcia, po czym inkubowano w 30 °C przez 18 godzin.

Miano faga odczytywano na podstawie wystąpienia lizy szczepu homologicznego według wzoru:

- miano faga 10^5 (całkowita liza w trzech rozcieńczeniach a w czwartym około 50 łysinek);
- miano faga 10^4 (całkowita liza w dwóch rozcieńczeniach a w trzecim około 50 łysinek);
- miano faga 10^3 (całkowita liza w pierwszym rozcieńczeniu a w drugim około 50 łysinek).

Do typowania *S. aureus* używano lizatów fagowych wykazujących miano co najmniej 10^5 . Lizaty rozcieńczano dziesięciokrotnie w bulionie sojowym (3% TSB, 0,1% KH_2PO_4 , pH=7,4) otrzymując $1\times\text{RTD}$ i $100\times\text{RTD}$ odpowiednio w czwartym i drugim rozcieńczeniu. Jako RTD przyjmowano najwyższe rozcieńczenie faga przy którym łysinki, utworzone przez faga w hodowli szczepu homologicznego, prawie zlewały się. Do typowania używano $1\times\text{RTD}$. W wypadku szczepów, które nie dawały co najmniej jednej silnej reakcji, typowanie powtarzano w $100\times\text{RTD}$ [16].

3.5.2. Oznaczanie wzorów fagowych

Typowanie bakteriofagowe przeprowadzono przy użyciu podstawowego zestawu 23 fagów zebranych w pięciu grupach litycznych [16, 162]:

- I grupa (29, 52, 52A, 79, 80, 81),
- II grupa (3A, 3C, 55, 71),
- III grupa (6, 42E, 47, 53, 54, 75, 77, 83A, 84, 85),
- V grupa (94, 96),
- typ 95 (95)
- grupa mieszana (szczepy typujące się fagami z kilku grup fagowych).

Zawiesinę bakterii (1 ml) o gęstości 0,5 w skali Mc Farlanda w fizjologicznym roztworze soli wylewano na płytkę z agarem do typowania fagowego, równomiernie rozprowadzano po powierzchni i nadmiar odciągano pipetą. Płytkę suszono w temperaturze pokojowej przez 30 minut i наносzono na nią w odpowiedniej kolejności po 20 μl zawiesinę fagów z podstawowego zestawu, w uprzednio zbadanym rozcieńczeniu. Po wyschnięciu kropli płytkę inkubowano w temperaturze 30 °C przez 18 godzin. Wynik typowania w $1\times\text{RTD}$ i $100\times\text{RTD}$ odczytywano przy użyciu lupy (powiększenie 10 $\times$) według schematu:

- słaba reakcja (od 1 do 50 łysinek),
- silna reakcja (powyżej 50 łysinek lub zlewna liza).

Wzór fagowy szczepu w $1\times\text{RTD}$ tworzyły numery fagów dające silną reakcję. Podobne zasady stosowano w odniesieniu do typowania w $100\times\text{RTD}$. Szczepy uznawano za różne, jeżeli wykazywały co najmniej dwie odmienne silne reakcje. Do badań kwalifikowano gronkowce, które były wrażliwe wyłącznie na fagi II grupy lub dodatkowo wykazywały słabe reakcje z fagami należącymi do innych grup w $100\times\text{RTD}$.

3.6. Określenie biotypów

W celu określenia biotypów, szczepy II grupy fagowej poddano badaniom na wytwarzanie fibrylizyny, hemolizyny β oraz sprawdzono u nich zdolność koagulowania plazmy bydlęcej i typ wzrostu na podłożu z fioletem krystalicznym. Dodatkowo oznaczono wytwarzanie białka A w celu odróżnienia szczepów biotypu P-like pA+ od biotypu Poultrey. Postępowano według schematu opisanego przez Devriese i Isigidi [41, 79].

3.6.1. Oznaczanie wytwarzania fibrylizyny

Do oceny wytwarzania fibrylizyny użyto bydlęcego fibrynogenu (frakcja I, typ I-S, Sigma, USA) jako substratu dla plazminy oraz surowicy psa (Sigma, USA) jako źródła plazminogenu. Bydlęcy fibrynogen rozpuszczono w 2-krotnie stężonym, jałowym bulionie odżywczym (Nutrient Broth no.2; Oxoid, UK) do końcowego stężenia równego 0,2%, i dodano do 3% rozpuszczonego agaru o takiej samej objętości. Mieszaninę ogrzewano w temperaturze 55 °C na łaźni wodnej przez 10 minut w celu precypitacji fibryny. Przed rozlaniem mieszaniny na płytkę dodano do niej surowicę psa do końcowego stężenia równego 0,5%. Płytką kontrolną miała taki sam skład podłoża, lecz nie zawierała surowicy psa. Badane szczepy – nie więcej niż 10 – nanoszono w postaci podłużnego rozmazu na płytkę testową i kontrolną o średnicy 90 mm każda. Wynik odczytywano po 24 i 48 godzinach inkubacji w atmosferze tlenowej, w temperaturze 37 °C. Występowanie strefy przejaśnienia wokół bakteryjnego wzrostu na płytce testowej i brak takiej strefy na płytce kontrolnej odczytywano jako wynik pozytywny. *S. aureus* Wood 46 użyto jako kontroli dodatniej [40].

3.6.2. Oznaczanie wytwarzania hemolizyny β

Oznaczenie wytwarzania hemolizyny β przez szczepy *S. aureus* przeprowadzono na podłożu Columbia agar (Oxoid, UK) z dodatkiem 5% krwi baraniej (Graso, Polska). Badane szczepy nanoszono na podłoże w postaci podłużnego rozmazu i inkubowano w atmosferze tlenowej przez 24 godziny w 37 °C. Jedynie pojawienie się charakterystycznej, ostro oddzielonej, szerokiej strefy odbarwienia podłoża, która w temperaturze 4 °C przez następne 18 godzin inkubacji przechodziła w całkowite przejaśnienie, odczytywano jako wynik dodatni. Występowanie innych stref przejaśnienia wokół rozmazu odczytywano jako wytwarzanie hemolizyn α i/lub δ . Szczep *S. aureus* ATCC 25923 użyto jako kontroli dodatniej [41].

3.6.3. Oznaczanie zdolności koagulowania plazmy bydlęcej

Badanie przeprowadzono w probówkach o średnicy 10 mm. Dodano do nich 0,5 ml 1- i 3-krotnie rozcieńczonej plazmy bydlęcej (Sigma, USA) oraz 18-godzinną hodowlę badanego szczepu na podłożu TSB (Difco, USA). Próby inkubowano w warunkach tlenowych przez 6 godzin w temperaturze 37 °C. Pojawienie się w tym czasie dużego skrzepu osocza bydlęcego odczytywano jako wynik dodatni [41].

3.6.4. Oznaczanie typu wzrostu na podłożu z fioletem krystalicznym

Hodowlę badanego szczepu nanoszono esą w postaci kolistego rozmazu o średnicy 6 mm na podłoże TSA (Difco, USA) z dodatkiem fioletu krystalicznego, rozcieńczonego w podłożu w stosunku 1: 100.000 (v/v). Płytki inkubowano w 37 °C w warunkach tlenowych przez 24 – 48 godzin, a następnie odczytywano wynik. Bakterie rosnące w postaci jaskrawożółtego lub bladożółtego rozmazu zaliczano do wzrostu typu „A”. Żółty rozmaz z fioletowym brzegiem oznaczano jako wzrost typu „B”. Fioletową barwę rozmazu z obecnością lub bez pomarańczowego odcienia odczytywano jako wzrost typu „C”. Niebieską barwę rozmazu zaliczano do wzrostu typu „D”. Biały rozmaz lub biały z niebieskim odcieniem zaliczano do wzrostu typu „E” [133].

3.6.5. Oznaczanie wytwarzania białka A metodą blottingu

Objętość 10 µl hodowli badanego szczepu (TSB, 37 °C, 18 godzin w łaźni wodnej z wytrząsaniem) nanoszono na nitrocelulozę (Schleicher & Schuell, Niemcy) i suszono w temperaturze pokojowej przez 60 minut. W celu zablokowania miejsc niespecyficznie wiążących przeciwciała, płukano ją w 3% BSA (Serva, Niemcy) przez 60 minut w temperaturze pokojowej, używając mieszała uchylnego. Następnie nitrocelulozę płukano w buforze TBS (10 mM Tris, pH=7,4; Serva, Niemcy) trzy razy po 15 minut, po czym zanurzano na 60 minut w roztworze przeciwciał króliczych (1/1.000 w TBS), znakowanych peroksydazą (DAKO, Dania). Po wypłukaniu nitrocelulozy w sposób opisany powyżej, wkładano ją do świeżo przygotowanego substratu dla peroksydazy. Był nim 4-chloro-1-naftol (13,5 mg) (Serva, Niemcy) rozpuszczony w alkoholu metylowym (4,15 ml) oraz bufor TBS (20,1 ml) z 30% H₂O₂ (12,5 µl). Nitrocelulozę inkubowano przez około 2 minuty do uzyskania fioletowogranatowego koloru w miejscu naniesionej kontroli dodatniej. Reakcję przerywano przenosząc nitrocelulozę do wody destylowanej. Siłę reakcji odczytywano w zależności od intensywności zabarwienia. Próby dodatnie miały fioletowogranatowe, fioletowe lub bladoniebieskie zabarwienie, a brak zabarwienia w miejscu naniesienia próby odczytywano jako wynik ujemny [91]. Szczep *S. aureus* Cowan I użyto jako kontroli dodatniej.

3.7. Typowanie genetyczne

3.7.1. Badanie polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych genomowego DNA (PFGE)

3.7.1.1. Przygotowanie wysokocząsteczkowego DNA

DNA bakteryjny o wysokiej masie cząsteczkowej uzyskano z bloczków agarozowych w wyniku ich inkubacji w roztworach enzymów hydrolizujących poszczególne składniki komórek według Chung i de Lencastre [29]. Pojedynczą kolonię badanego szczepu przesiano na podłoże MHA II (BBL, USA) z dodatkiem 5% krwi baraniej, a następnie inkubowano w warunkach tlenowych przez 18 godzin w temperaturze 37 °C. Z wyrosłych bakterii sporządzono zawiesinę o gęstości 3,5 w skali Mc Farlanda w fizjo-

logicznym roztworze soli. Zawiesinę o objętości 1,5 ml przeniesiono do probówki Eppendorfa, zwirowano (8.000 obr./min), supernatant odrzucono, a osad bakteryjny zawieszono w 150 µl buforu PIV (0,01 M Tris pH=8,0; 1 M NaCl). Następnie dodano 150 µl ogrzanej do temperatury 50 °C płynnej agarozy SeaPlaque (FMC, USA) o stężeniu 2%, i dokładnie wymieszano. Mieszaninę nanoszono w ilości po 20 µl na płytkę szklaną powleczoneą warstwą parafilmu (Sigma, USA) i odtłuszczoną za pomocą 95% etanolu. Krople przykrywano odtłuszczonymi, mikroskopowymi szkiełkami podstawowymi na wysokości około 3 mm od parafilmu, tak by przybrały kształt krążka. Płytkę z krążkami pozostawiono przez 5 minut w temp. -20 °C, następnie przenoszono je do probówek typu Eppendorf (Saerstedt, Niemcy) i dodawano świeżo przygotowanego roztworu EC (6 mM Tris pH=8,0; 1 M NaCl; 0,1 M EDTA; 0,2% deoksycholan sodu; 0,2% sarkozyl, 50 µg/ml RNAza A; 100 µg/ml lizozym) (Sigma, USA); 50 µl/ml lizostafiny (AMBI Inc., USA) i inkubowano w temperaturze 37 °C przez 4 godziny. Enzymy: RNAzę i lizozym dodawano do buforu tuż przed użyciem. Roztwór EC usuwano, krążki agarozowe zalewano 1 ml roztworu ESP (0,5 M EDTA pH=9; 1% sarkozyl; 1 mg/ml proteinaza K) (Boehringer-Manheim, Niemcy). Krążki inkubowano w takim buforze przez 18 godzin w temperaturze 50 °C. Roztwór ESP odrzucano a krążki zalewano 10 ml roztworu TE (10 mM Tris pH=7,5; 1 mM EDTA; Sigma, USA) i płukano z łagodnym wytrząsaniem przez 15 minut w temperaturze pokojowej. Roztwór TE zlewano a proces płukania powtarzano jeszcze cztery razy. Krążki przenoszono do nowych probówek typu Eppendorf, zalano 1 ml roztworu TE i przechowywano w temperaturze 4 °C.

3.7.1.2. Trawienie DNA enzymem restrykcyjnym

Krążek zawierający wysokocząsteczkowy DNA przeniesiono do probówki Eppendorfa, zalano 100 µl buforu Yellow Tango® (MBI Fermentas, Litwa) i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 15 minut. Następnie bufor odpipetowano, a krążek zalano 50 µl buforu Yellow Tango® zawierającego 20 U enzymu *Sma*I (MBI Fermentas, Litwa). Przeprowadzono trwającą 3,5 godziny inkubację w temperaturze pokojowej. Mieszaninę odpipetowano, a krążek zalano 250 µl roztworu TE (Sigma, USA). Następnie próbki chromosomalnego DNA poddano elektroforezie w zmiennym polu elektrycznym przy wykorzystaniu aparatu CHEF DR-II (BioRad, USA). Jednocześnie stosowano Lambda Ladder PFG Marker (New England Biolabs, USA) jako standard wielkości liniowych cząsteczek DNA, umożliwiając skorygowanie, w procesie komputerowej analizy wzorów restrykcyjnych, efektów nierównomiernego rozdziału poszczególnych próbek.

3.7.1.3. Rozdział elektroforetyczny

Elektroforezę prowadzono w 1% żelu przygotowanym z agarozy Pulsed Field Certified (BioRad, USA) w 0,5 × stężonym buforze TBE (45 mM Tris-base, 45 mM kwas borowy, 1 mM EDTA). Krążki z preparatami DNA umieszczano w studzienkach żelu i zalewano 0,8% agarozą Pulsed Field Certified (BioRad, USA). Stosowano następujące parametry elektroforezy: temperatura (12 °C), różnica potencjału między elektrodami (6 V), początkowy czas pulsu (1 sekunda), końcowy czas pulsu (30 sekund), czas elek-

troforezy (22 godz.). Po przeprowadzonej elektroforezie żel barwiono przez 30 min w roztworze bromku etyldyny (15 μ l) i płukano w wodzie destylowanej przez 30 minut.

3.7.1.4. Analiza wzorów restrykcyjnych

Otrzymane wzory restrykcyjne porównywano i określano ich podobieństwo przy użyciu programu Molecular Analyst Software, Fingerprinting v. 1.12 (BioRad, USA). Ostateczną analizę prowadzącą do uzyskania dendrogramu wykonano na reprezentatywnej grupie wzorów restrykcyjnych, wybierając po jednym przedstawicielu dla każdej grupy wzorów uznanych za identyczne (podtypów). W analizie zastosowano współczynnik podobieństwa Dice'a oraz metodę grupowania UPGMA [203]. Ze względu na przeprowadzenie precyzyjnej, ręcznej korekty zaburzeń położenia prążków, oraz bardzo subtelne różnice pomiędzy niektórymi wzorami, przyjęto restrykcyjny wskaźnik tolerancji pozycji prążków wynoszący 0,45%. Oznacza on dopuszczalną różnicę położenia dwóch prążków uznawanych przez oprogramowanie za identyczne. Zgodnie z przyjętymi zasadami, analizie podlegały prążki odpowiadające fragmentom DNA nie mniejszym niż 50.000 par zasad (położone powyżej najniższego prążka standardu wielkości).

Na podstawie uzyskanego dendrogramu określono przynależność izolatów do typów i podtypów. Zastosowano tzw. linię odcięcia na poziomie ok. 50 w skali dendrogramu, co oznacza, że za należące do jednego typu uznawano izolaty, których gałęzie rozchodzą się powyżej tego punktu. Przyjmując niską wartość linii odcięcia dążono do zaliczenia do danego typu, izolatów wykazujących w analizie wzrokowej niewątpliwe podobieństwo wzorów czyli spodziewane pokrewieństwo. Dodatkową wskazówkę w takim postępowaniu stanowiły fragmenty mniejsze niż 50.000 par zasad, nieuwzględniane przy analizie komputerowej. Typy PFGE definiowano według kryteriów przyjętych przez Tenowera i wsp. [208]. Izolaty, które posiadały identyczne wzory PFGE, uznawano za identyczne i kwalifikowano je do jednego podtypu. Izolaty z wzorami różniącymi się nie więcej niż trzema prążkami uznawano za ściśle spokrewnione i określano jako podtyp należący do jednego typu PFGE. Izolaty z wzorami PFGE różniącymi się prążkami w ilości od czterech do sześciu prążków uznawano za prawdopodobnie spokrewnione. Izolaty uznawano za niespokrewnione jeżeli różniły się większą niż sześć liczbą prążków. Typy zostały oznaczone kolejnymi literami alfabetu i podzielone na podtypy (wyróżniane liczbą stojącą przy literze oznaczającej typ). Przy nadawaniu oznaczeń stosowano zasadę używania wcześniejszej litery alfabetu i niższej liczby dla typów i podtypów liczniej reprezentowanych. Na dendrogramie umieszczono oznaczenia podtypów, którym odpowiadają poszczególne gałęzie. W przypadku podtypów reprezentowanych przez więcej niż jeden izolat w nawiasie wskazano liczebność podtypu.

3.7.2. Typowanie genu białka A (*spa*)

3.7.2.1. Izolowanie DNA

Bakteryjny DNA o wysokim ciężarze cząsteczkowym oczyszczano z komórkowego lizatu stosując zestaw Easy Genomic DNA Preparation (A&A Biotechnology, Polska) według Barskiego i wsp. [14]. Objętość 1 ml 18-godzinnej hodowli *S.aureus* w podłożu

TSB (Difco, USA) wirowano (12000 obr./min) przez 5 minut, osad zawieszano w 200 μ l roztworu 2% Triton X-100 w 2 M NaCl (Serva, Niemcy). Lizostafinę (Sigma, USA) o objętości 2,5 μ l dodawano do uzyskania końcowego stężenia 25 μ g/ml. Zawiesinę dokładnie mieszano i inkubowano w 37 °C przez 30 minut w termobloku. Następnie dodawano 1 μ l proteinazy K (20 mg/ml; Sigma, USA), podwyższając jednocześnie temperaturę inkubacji do 65 °C. Po 15 minutach zawiesinę chłodzono do temperatury pokojowej, dodawano 400 μ l chloroformżelu (A&A Biotechnology, Polska) i całość mieszano (vortex, DHN, Polska) przez 10 sekund a potem odwirowywano (8000 obr./min) przez 5 minut. Górną fazę odpipetowywano do nowej probówki, zawarty w niej DNA wytrącano przy pomocy 300 μ l alkoholu izopropylowego (Serva, Niemcy). Próbkę pozostawiano przez 18 godzin w temperaturze -20 °C. Po odwirowaniu, osad przemywano 70% alkoholem etylowym i suszono w temperaturze pokojowej. DNA rozpuszczano w 100 μ l buforu TE (10 mM Tris pH=8; 1 mM EDTA; Sigma, USA) i jego stężenie określano spektrofotometrycznie (Kalkulator DNA, Pharmacia). DNA-przechowywano w temperaturze -20 °C, a do reakcji PCR rozcieńczano go jałową, dejonizowaną wodą, do stężenia 5 ng/ μ l.

3.7.2.2. Reakcja PCR

W reakcji PCR amplifikowano polimorficzny fragment X genu *spa* kodującego białko A. Wybrano startery [59] o sekwencjach:

SPA-1 (5' CAA GCA CCA AAA GAG GAA 3'),

SPA-2 (5' CAC CAG GTT TAA CGA CAT 3') (Sigma, USA).

DNA bakteryjne w ilości 5 μ l (5 ng/ μ l) mieszano z 5 μ l buforu reakcyjnego (100 mM Tris – HCL pH=8; 500 mM KCL, 15 mM MgCl₂, 0,8% detergent; MBI Fermentas, Litwa), 5 μ l mieszaniny dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) o stężeniu 2 mM każdy, 1 μ l każdego ze starterów SPA-1 i SPA-2 (100 μ M stężenie każdego), 2 U Taq DNA polimerazy (MBI Fermentas, Litwa) i dopełniano do objętości 50 μ l wodą (Sigma, USA). Amplifikację przeprowadzano w automatycznym termocyklerze GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer) według schematu:

95 °C przez 4 minuty (denaturacja wstępna)

95 °C przez 1 minutę (denaturacja),

60 °C przez 1 minutę (przyłączanie starterów)

72 °C przez 1 minutę (wydłużanie syntetyzowanego łańcucha). Przeprowadzono 25 cykli amplifikacyjnych obejmujących denaturację, przyłączanie starterów i wydłużanie łańcucha. W ostatnim cyklu prowadzono dodatkowo całkowitą polimeryzację w 72 °C przez 3 minuty [59].

3.7.2.3. Elektroforeza produktu PCR

Wyniki amplifikacji odczytywano na 4% żelu agarozowym (Sigma, USA) wobec bromku etydylny (ICN Biomedicals Inc., Austria). W tym celu do 10 μ l mieszaniny reakcyjnej dodawano 2 μ l buforu obciążającego (60% glicerol, 0,09% błękit bromofenolowy, 0,09% ksilen, 60 mM EDTA; MBI Fermentas, Litwa) i całość nanoszono na przykryte

buforem TAE (0,04 M Tris-octan, 0,001 M EDTA; Sigma, USA) studzienki w żelu agarozowym (2% agarozu w buforze TAE z dodatkiem bromku etydyny; Sigma, USA). Elektroforezę prowadzono przez 90 minut (natężenie 45 mA) z wykorzystaniem zasilacza STABNAP 300 (Kucharczyk TE, Polska) i następnie żel fotografowano na transiluminatorze UV (Sigma, USA). Wielkość zamplifikowanego fragmentu genu *spa* porównywano z pozycją markerów ciężaru cząsteczkowego (GeneRuler 50 bp DNA Ladder, MBI Fermentas, Litwa).

3.7.2.4. Sekwencjonowanie produktu PCR i określenie typów *spa* oraz kompleksów klonalnych *spa*-CC

Spośród badanych szczepów II grupy fagowej (n=112) wyznaczono do sekwencjonowania 40 gronkowców. Wybierano przeważnie po 1 izolacie z każdego typu PFGE, a w wypadku najliczniejszego typu (PFGE – A) po jednym izolacie z każdego podtypu (n=23). Badaniu poddano również wszystkie szczepy izolowane od zwierząt. Sekwencjonowanie produktu PCR przeprowadzono przy użyciu aparatu ABI 377 (Applied Biosystems, Foster City, California). Otrzymane krótkie sekwencje powtórzone (SSR) ponumerowano i opracowano posługując się programem Ridom SpaType, który jest dostępny na stronie <http://spaserver.ridom.de>. Wynik podawano w postaci kodu numerycznego określającego typy *spa*. W celu określenia klonalnych powiązań między szczepami o różnych typach *spa*, pogrupowano je w kompleksy klonalne (*spa*-CC). Do tego celu użyto algorytmu BURP, korzystając z programu Ridom Staph Type software w wersji Demo [129]. Nazwę kompleksu klonalnego (*spa*-CC) tworzył typ *spa* zwany „founderem”, który był najbardziej spokrewniony z pozostałymi typami *spa* w kompleksie [129]. W skład kompleksu klonalnego wchodziły różne typy *spa* dla których stopień ewolucji pomiędzy dwoma szczepami („cost”) o różnych typach *spa* był mniejszy od 4 [129, 130].

3.8. Badane cechy genotypowe

3.8.1. Wykrywanie genu *fibrylizyny*

W reakcji PCR amplifikowano fragment genu *sak* kodującego fibrylizynę. Posiada on sekwencje konserwowane, występujące u wszystkich znanych wariantów tego genu [92]. Do reakcji wybrano startery o następujących sekwencjach:

SAK1 (5' CGC AGG AGG CCT CAT ATG TCA AGT TCA TTC GAC AAA GGA AAA TAT 3');

SAK2 (5' GCT CGG CAT GCT GCT GCA GTT ATT TCT TTT CTA TAA CAA CCT TTG 3') (Sigma, USA) [92].

3.8.1.1. Reakcja PCR i elektroforeza produktu reakcji

DNA bakteryjne izolowano i przygotowywano do reakcji PCR zgodnie z metodyką opisaną w punkcie 3.7.2.1 i dodano do mieszaniny reakcyjnej przygotowanej zgodnie z punktem 3.7.2.2. Użyto starterów SAK-1 i SAK-2 o stężeniu 100 µM każdy. Amplifika-

cję przeprowadzano w automatycznym termocyklerze GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer) według schematu:

- 94 °C przez 1 minutę (denaturacja),
- 56 °C przez 1 minutę (przyłączanie starterów)
- 72 °C przez 2 minuty (wydłużanie syntetyzowanego łańcucha).

Przeprowadzono 30 cykli amplifikacyjnych. W ostatnim cyklu prowadzono dodatkowo całkowitą polimeryzację w 72 °C przez 2 minuty [92]. Wyniki amplifikacji odczytywano na 2% żelu agarozowym (Sigma, USA) przygotowanym według punktu 3.7.2.3. Wielkość zamplifikowanego fragmentu genu *sak* (410 par zasad) porównywano z pozycją markerów ciężaru cząsteczkowego (pUC19 DNA/MspI Marker 23; MBI Fermentas, Litwa). Kontrolę ujemną stanowiła mieszanina reakcyjna poddana reakcji PCR, bez dodania DNA bakteryjnego.

3.8.2. Wykrywanie genów toksyn gronkowcowych

Metodą multiplex PCR oznaczano geny odpowiedzialne za produkcję eksfoliatyn: A i B (*eta*, *etb*), enterotoksyn A, B, C, D (*sea*, *seb*, *sec*, *sed*) oraz toksyny wstrząsu toksycznego TSST-1 (*tst*).

Tabela 2. Startery zastosowane w reakcji PCR do amplifikacji genów toksyn gronkowcowych

Table 2. Primers used in PCR amplification of staphylococcal toxin genes

Starter <i>Primer</i>	Sekwencje starterów (5' – 3') <i>Sequence of primers (5' – 3')</i>	Wielkość produktu <i>Size of product (pz)</i>
SEA1 SEA2	GGT TAT CAA TGT GCG GGT GG CGG CAC TTT TTT CTC TTC GG	102
SEB1 SEB2	GTA TGG TGG TGT AAC TGA GC CCA AAT AGT GAC GAG TTA GG	164
SEC1 SEC2	AGA TGA AGT AGT TGA TGT GTA TGG CAC ACT TTT AGA ATC AAC CG	451
SED1 SED2	CCA ATA ATA GGA GAA AAT AAA AG ATT GGT ATT TTT TTT CGT TC	287
TSST1-1 TSST1-2	ACC CCT GTT CCC TTA TCA TC TTT TCA GTA TTT GTA ACG CC	326
ETA-1 ETA-2	GCA GGT GTT GAT TTA GCA TT AGA TGT CCC TAT TTT TGC TG	93
ETB-1 ETB-2	ACA AGC AAA AGA ATA CAG CG GTT TTT GGC TGC TTC TCT TG	226
PVL-1 PVL-2	ATCATTAGGTAATAATGTCTGGACATGATCCA GCA TCA ACT GTA TTG GAT AGC AAA AGC	433

Metodą PCR wykrywano geny leukocydyny Panton-Valentina (*lukS-PV / lukF-PV*). Startery używane w reakcji PCR (Sigma, USA) wybrano według opracowania Mehrotra i wsp. [128] z wyjątkiem PVL-1, PVL-2 [121]. Sekwencje starterów oraz wielkość otrzymanego produktu przedstawia tabela 2.

3.8.2.1. Reakcja multiplex PCR i elektroforeza produktów reakcji

DNA izolowano i przygotowywano do reakcji PCR zgodnie z metodyką opisaną w punkcie 3.7.2.1. Reakcję multiplex PCR przeprowadzano z zastosowaniem dwóch różnych mieszanin starterów (A i B). Mieszanina A zawierała po 20 pmoli starterów dla genów *sea*, *seb* i *sec*, 40 pmoli startera dla genu *sed* oraz 5 µl buforu reakcyjnego stężonego dziesięciokrotnie (100 mM Tris-HCL, pH=8,3; 500 mM KCL; 0,8% detergent; MBI Fermentas, Litwa), 1,5 mM MgCl₂, 200 µM mieszaniny trójfosforanów dezoxyrybonukleozydów (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 2 U Taq DNA polimerazy (MBI Fermentas, Litwa), 5 µl bakteryjnego DNA (5 ng/µl) oraz dejonizowaną wodę (Sigma, USA), którą dopełniano mieszaninę reakcyjną do całkowitej objętości równej 50 µl. Mieszanina B zawierała podobny do mieszaniny A skład odczynników z wyjątkiem MgCl₂ (2 mM) i starterów dla genów: *eta* (50 pmoli), *eth* (20 pmoli) oraz *tst* (20 pmoli). Amplifikację przeprowadzono w automatycznym termocyklerze GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer, USA), zgodnie ze schematem:

- 94 °C przez 5 minut (denaturacja wstępna),
- 94 °C przez 2 minuty (denaturacja),
- 57 °C przez 2 minuty (przyłączanie starterów)
- 72 °C przez 1 minutę (wydłużanie syntetyzowanego łańcucha).

Przeprowadzono 35 cykli amplifikacyjnych obejmujących denaturację, przyłączanie starterów i wydłużanie łańcucha. W ostatnim cyklu przeprowadzono dodatkowo całkowitą polimeryzację w 72 °C przez 7 minut [128].

Do wykrywania genów leukocydyny Panton-Valentine (*lukS-PV / lukF-PV*) przygotowano 50 µl mieszaniny reakcyjnej według schematu umieszczonego w punkcie 3.7.2.2. używając po 1 µl starterów PVL-1, PVL-2 (100 mM). Amplifikację przeprowadzono według schematu (30 cykli):

- 94 °C przez 0,5 minuty (denaturacja),
- 55 °C przez 0,5 minuty (przyłączanie starterów)
- 72 °C przez 1 minutę (wydłużanie syntetyzowanego łańcucha) [121].

Elektroforezę przeprowadzano w 4% żelu agarozowym, zgodnie z metodyką opisaną w punkcie 3.7.2.3. Wielkość zamplifikowanych fragmentów porównywano z pozycją markera ciężaru cząsteczkowego (pUC19 DNA/MspI Marker 23; MBI Fermentas, Litwa) i ze szczepami wzorcowymi. Kontrolę ujemną stanowiła mieszanina bez dodatku DNA bakteryjnego, poddana reakcji PCR.

3.8.3. Wykrywanie genów adhezyn gronkowcowych

Metodą multiplex PCR wykrywano geny kodujące białka wiążące elastynę (*ebp*), sialoproteinę kostną (*bbp*), kolagen (*cna*), fibrynogen (*fib*) oraz fibronektynę (*fnbB*) w

szczepach *S. aureus* [211]. Startery używane w reakcji PCR (Sigma, USA) oraz wielkość otrzymanego produktu przedstawiono w tabeli 3.

Tabela 3. Startery zastosowane w reakcji PCR do amplifikacji genów adhezyn gronkowcowych
Table 3. Primers used in PCR amplification of staphylococcal adhesin genes

Starter	Sekwencje starterów (5' – 3')	Wielkość produktu (pz)
EBP1 EBP2	CAT CCA GAA CCA ATC GAA GAC CTTAACAGTTACATCATCATGTTTATCTTTG	186
CNA1 CNA2	GTC AAG CAG TTA TTA ACA CCA GAC AAT CAG TAA TTG CAC TTT GTC CAC TG	423
BBP1 BBP2	AAC TAC ATC TAG TAC TCA ACA ACA G ATG TGC TTG AAT AAC ACC ATC ATC T	575
FIB1 FIB2	CTA CAA CTA CAA TTG CCG TCA ACA G GCT CTT GTA AGA CCA TTT TCT TCA C	404
FNBB1 FNBB2	GTA ACA GCT AAT GGT CGA ATT GAT ACT CAA GTT CGA TAG GAG TAC CTA TGT TC	524

3.8.3.1. Reakcja multiplex PCR i elektroforeza produktów reakcji

DNA izolowano i przygotowywano do reakcji PCR zgodnie z metodyką opisaną w punkcie 3.7.2.1. Dwie różne mieszaniny starterów używano do reakcji multiplex PCR. Pierwsza zawierała startery dla genów: *bbp*, *cna* i *ebp*, druga – dla genów: *fib* i *fnbB* – w stężeniu po 20 pmoli każdy. Pozostałe składniki mieszaniny reakcyjnej przygotowano według punktu 3.7.2.2. Amplifikację przeprowadzono w automatycznym termocyklerze GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer, USA) według schematu:

- 94 °C przez 5 minut (denaturacja wstępna),
- 94 °C przez 1 minuta (denaturacja),
- 55 °C przez 1 minutę (przyłączanie starterów)
- 72 °C przez 1 minutę (wydłużanie łańcucha).

Przeprowadzono 25 cykli amplifikacyjnych obejmujących denaturację, przyłączanie starterów i wydłużanie łańcucha. W ostatnim cyklu prowadzono dodatkowo całkowitą polimeryzację w 72 °C przez 10 minut. Elektroforezę przeprowadzano w 4% żelu agarozowym, zgodnie z metodyką opisaną w punkcie 3.7.2.3. Wielkość amplifikowanych fragmentów porównywano z pozycją markera ciężaru cząsteczkowego (GeneRuler 50 bp DNA Ladder, MBI Fermentas, Litwa). Kontrolę ujemną stanowiła mieszanina bez dodatku DNA bakteryjnego, poddana reakcji PCR.

3.8.4. Wykrywanie genu *mecA*

Oporność na metycylinę określono wstępnie za pomocą krążka z cefoksytiną. Szczepy *S. aureus*, które dawały wyniki wątpliwe w postaci obecności mikrokolonii w strefie zahamowania wzrostu, lub wykazywały oporność na cefoksytinę, zostały poddane badaniu metodą PCR na obecność genu *mecA* kodującego oporność na metycylinę [14]. W reakcji PCR zastosowano startery o następujących sekwencjach:

Mec 1 (5' AAA ATC GAT GGT AAA GGT TGG C 3')

Mec 2 (5' AGT TCT GCA GTA CCG GAT TTG C 3') (Sigma, USA).

3.8.4.1. Reakcja PCR i elektroforeza produktu reakcji

DNA bakteryjne otrzymane zgodnie z metodyką w punkcie 3.7.2.1. dodano do mieszaniny reakcyjnej sporządzonej według punktu 3.7.2.2. Amplifikację przeprowadzono według schematu:

- 94 °C przez 3 minuty (denaturacja wstępna),
- 96 °C przez 1 minutę,
- 55 °C przez 0,5 minuty,
- 72 °C przez 1,5 minuty.

Po denaturacji wstępnej przeprowadzono 40 cykli. W ostatnim cyklu prowadzono dodatkowo całkowitą polimeryzację w 72 °C przez 3 minuty. Elektroforezę przeprowadzano w 2% żelu agarozowym, zgodnie z metodyką opisaną w punkcie 3.7.2.3. Obecność prążka DNA wielkości około 533 par zasad na ścieżce elektroforetycznej uznawano za wynik dodatni (według pozycji markera pUC19 DNA/MspI Marker 23; MBI Fermentas, Litwa). Kontrolę ujemną stanowiła mieszanina reakcyjna bez bakteryjnego DNA, poddana reakcji PCR.

3.9. Badane cechy fenotypowe

3.9.1. Oznaczanie wrażliwości szczepów na antybiotyki

3.9.1.1. Metoda dyfuzyjno-krążkowa

Badanie wrażliwości szczepów na antybiotyki z różnych grup przeprowadzono metodą dyfuzyjno-krążkową na podłożu MHA zgodnie z metodyką opisaną w CLSI [31, 32]. Przy doborze krążków z antybiotykami kierowano się aktualnymi rekomendacjami Krajowego Ośrodka Referencyjnego do spraw Lekowrażliwości Drobnoustrojów [77, 225]. Zastosowano krążki z następującymi antybiotykami: penicylina (Pe 10 U), cefoksytyna (FOX 30 µg), kotrimoksazol (SXT – Sulfamethoxazol 23,75 µg + Trimetoprim 1,25 µg), ciprofloksacyna (Cip 5 µg), wankomycyna (Va 30 µg), teikoplanina (Tec 30 µg), kwas fusydowy (Fa 10 µg), chloramfenikol (C 30 µg), gentamycyna (Ge 10 µg), rifampicyna (Rf 10 µg), klindamycyna (CC 2 µg), erytromycyna (E 15 µg) mupirocyna (Mup 200 µg), streptomycyna (S 10 U) (Becton Dickinson, USA; Oxoid, UK). Oporność na tetracykliny zbadano używając krążków z tetracykliną (T 30 µg) i z minocykliną (M

30 µg) (Oxoid, UK). Badane szczepy zawieszano w jałowym, fizjologicznym roztworze soli, do uzyskania gęstości optycznej równej 0,5 w skali Mc Farlanda (czytnik ATB; BioMerieux, Francja). Zawiesinę nanoszono na podłoże MHA jałową wymazówką i nakładano krążki z antybiotykami w ilości nie więcej niż 5 na płytkę o średnicy 90 mm. W celu oznaczenia fenotypu oporności typu MLS_B (makrolidy, linkosamidy, streptogramina B) stosowano krążki z klindamycyną (CC 2 µg) i erytromycyną (E 15 µg) w odległości 15 – 26 mm między krawędziami krążków. W celu oznaczenia indukcyjnego fenotypu oporności na minocyklinę posłużono się testem 2 krążków: tetracykliny (T 30 µg) i minocykliny (M 30 µg). Krążki T 30 i M 30 ułożono na podłożu MHA obok siebie w odległości 8 – 9 mm od krawędzi krążka [212].

Płytki z nałożonymi krążkami inkubowano w atmosferze tlenowej, w temperaturze 35 °C przez 18 godzin. W wypadku cefoksytyny i wankomycyny inkubację wydłużono do 24 godzin. Wyniki odczytywano poprzez zmierzenie średnicy strefy zahamowania wzrostu wokół krążka z antybiotykiem. Interpretację antybiogramów przeprowadzono w oparciu o dane CLSI [31] oraz według zaleceń Krajowego Ośrodka Referencyjnego do spraw Lekowrażliwości Drobnoustrojów [77, 225], z wyjątkiem kwasu fusydowego i streptomycyny [200]. Wrażliwość na mupirocynę oceniono według Finlay i wsp. [55].

Fenotyp oporności na makrolidy i linkosamidy odczytywano jako indukcyjny MLS_B, jeżeli strefa zahamowania wzrostu wskazywała oporność na erytromycynę, a strefa wokół krążka z klindamycyną była ścięta od strony krążka z erytromycyną [77]. W wypadku konstytutywnego mechanizmu oporności MLS_B, występowała oporność na erytromycynę i klindamycynę zgodnie z wytycznymi CLSI [31].

Fenotyp oporności na minocyklinę odczytywano jako indukcyjny jeżeli nastąpiło ścięcie strefy zahamowania wzrostu bakterii wokół krążka z minocykliną (M 30) od strony tetracykliny – dodatni test dwóch krążków [212].

3.9.1.2. Oznaczenie najmniejszego stężenia hamującego (MIC) tetracykliny

Badaniu poddano szczepy *S. aureus* II grupy fagowej odporne na tetracyklinę w metodzie dyfuzyjno-krążkowej. Z hodowli badanego szczepu (według metodyki w punkcie 3.3) przygotowano zawiesinę w jałowym, fizjologicznym roztworze soli o gęstości 0,5 w skali Mc Farlanda (około $1 - 2 \times 10^8$ CFU/ml). Gęstość zawiesiny określono nefelometrycznie za pomocą czytnika ATB (Bio Merieux, Francja). Zawiesinę rozcieńczano 1:10 w jałowym, fizjologicznym roztworze soli i nanoszono w ilości 2 µl (około 10^4 CFU) za pomocą pipety automatycznej na serię stałych podłoży MHA ze wzrastającymi stężeniami tetracykliny: 16, 32, 64, 128, 256 mg/l (Fluka, Chiny). Na każdej płytce umieszczano po około 20 zawiesin badanych szczepów. Kontrole wzrostu stanowiły dwa podłoża bez antybiotyku, na które nanoszono po 2 µl zawiesiny badanego szczepu przed i po naniesieniu szczepów na podłoża z antybiotykiem. Płytki inkubowano w temperaturze 35 °C przez 24 godziny w atmosferze tlenowej [32]. Wartość MIC określano, jako najmniejsze stężenie tetracykliny, które powodowało zahamowanie wzrostu bakterii widoczne nieuzbrojonym okiem.

3.9.2. Oznaczanie właściwości lipolitycznych

Właściwości lipolityczne badanego szczepu oznaczano na podłożu TSA (Difco, USA) z dodatkiem 1% Tween 80 i 0,1% CaCl₂ (Serva, Niemcy). Szczepy *S. aureus* wysiewano na przygotowane wcześniej płytki w postaci podłużnego rozmazu, nie więcej niż 10 na płytkę o średnicy 90 mm. Inkubację prowadzono w warunkach tlenowych, przez 24 godziny w temperaturze 37 °C. Jeżeli szczep wytwarzał lipazę rozkładającą Tween 80 to wokół rozmazu powstawała wyraźna strefa zmętnienia [196].

3.10. Metody statystyczne

Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu programu Statistica 8.0. (GU-Med.). Do oceny różnic występujących między porównywanymi grupami gronkowców w występowaniu genów toksyn, adhezyn oraz we wrażliwości na fagi, aktywności biochemicznej czy oporności na antybiotyki zastosowano test Fishera. Wartość $p \leq 0,05$ przyjęto jako różnicę statystycznie znaczącą.

4. WYNIKI

4.1. Szczepy *Staphylococcus aureus* II grupy fagowej izolowane od ludzi

4.1.1. Podział na biotypy

Podział na biotypy gronkowców II grupy fagowej przeprowadzono w oparciu o kryteria przyjęte przez Devriese i Isigidi – tabela 4 [41, 79].

Tabela 4. Właściwości biotypów *S.aureus* zgodnie z kryteriami Devriese i Isigidi
Table 4. Properties of *S. aureus* biotypes according to Devriese and Isigidi scheme

Biotyp <i>Biotype</i>	Fibrynolizyna <i>Staphylokinase</i>	Hemolizyna β <i>β-hemolysin</i>	Koagulacja plazmy bydlęcej <i>Bovine plasma coagulation</i>	Fiolet krystaliczny <i>Crystal Violet type</i> ¹⁾	Białko A <i>Protein A</i>
ludzki <i>human</i>	+	+, –	–	A, C	*
bydlęcy <i>bovine</i>	–	+	+	A	*
owczy <i>ovine</i>	–	+	+	C	*
drobiowy <i>poultry</i>	–	–	–	A	–
P-like pA +	–	–	–	A	+
NHS 1	+	–	+	A	*
NHS 2	+	+	+	A	*
NHS 3	–	+	–	A	*
NHS 4	–	+	–	C	*
NHS 5	–	–	–	C	*

NHS – *non-host-specific*; P-like pA+ – *Poultry like protein A positive*;

¹⁾ typ wzrostu na podłożu z fioletem krystalicznym / *type of growth on crystal violet agar*;

* cecha uwzględniana wyłącznie do odróżnienia biotypu drobiowego od biotypu P-like pA+ / *a property regards only to differentiate of poultry biotype from P-like pA+ biotype*.

Wśród gronkowców złocistych II grupy bakteriofagowej (n=112) wyróżniono dwa główne biotypy: P-like pA+ i ludzki – tabela 5. Biotyp P-like pA+ obejmował ponad połowę badanych szczepów (58,9%), podczas gdy około 40% gronkowców należało do biotypu ludzkiego (39,3%). Jedynie dwa badane szczepy miały cechy biotypu NHS 4

(1,8%) łączącego zarówno właściwości biotypu ludzkiego jak i biotypów zwierzęcych. Szczepy biotypu P-like pA+, w odróżnieniu od biotypu ludzkiego, nie produkowały fibrynolizyny i nie posiadały genu *sak* odpowiedzialnego za jej produkcję (rycina 1, rycina 2). Ponadto charakteryzowały się brakiem wytwarzania hemolizyny β , ujemną reakcją z plazmą bydlęcą oraz typem wzrostu „A” na podłożu z fioletem krystalicznym (tabela 4). Gronkowce biotypu ludzkiego, oprócz wytwarzania fibrynolizyny, wykazywały ujemną reakcję z plazmą bydlęcą, nie produkowały hemolizyny β i miały typ wzrostu „C” (22,3%) lub „A” (17%) na podłożu z fioletem krystalicznym (tabela 4, tabela 5).

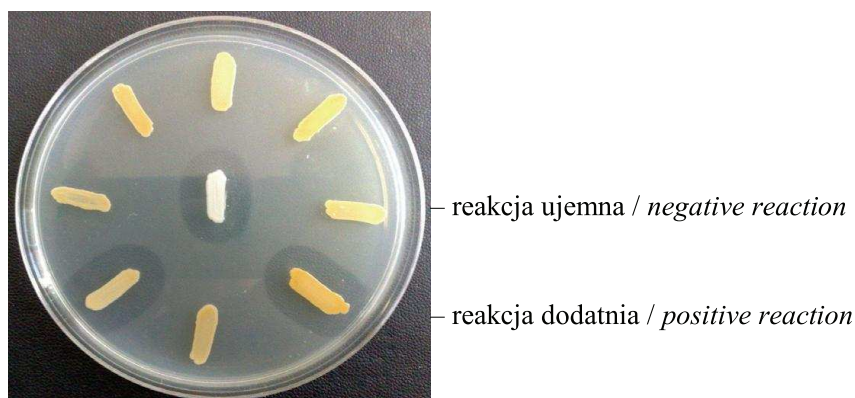
Tabela 5. Podział gronkowców II bakteriofagowej na biotypy zgodnie z kryteriami Devriese i Isigidi

Table 5. Subdivision of phage group II staphylococci into biotypes according to Devriese and Isigidi scheme

Biotyp / Biotype	Badane szczepy / Tested strains n (%)
ludzki „C”/ human “C”	25 (22,3)
ludzki „A”/ human “A”	19 (17)
bydlęcy / bovine	0
owczy / ovine	0
drobiowy / poultry	0
P-like pA +	66 (58,9)*
NHS 4 / non-host-specific 4	2 (1,8)
razem / total	112 (100)

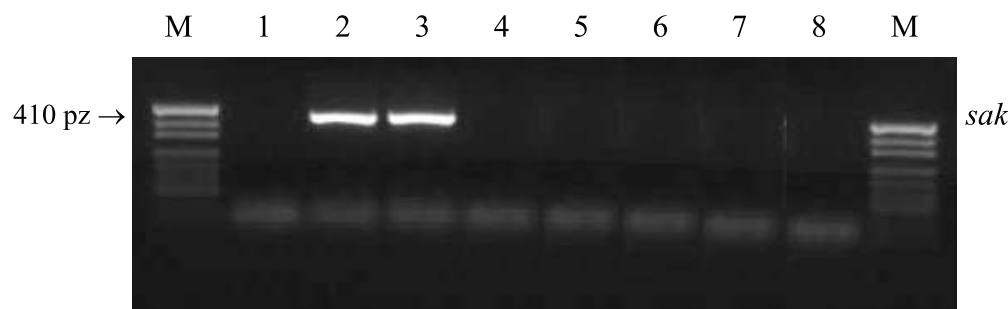
n – liczba badanych szczepów / the number of tested strains;

* szczepy, u których nie wykryto genu *sak* kodującego fibrynolizynę / strains with negative result test for *sak* gene coding the staphylokinase.



Ryc. 1. Wytwarzanie fibrynolizyny

Fig. 1. Staphylokinase production



M – marker wielkości DNA (pUC19 DNA/MspI enzyme, Fermentas, Litwa); ścieżka 1 – kontrola ujemna; ścieżki 2–3 – kontrola dodatnia; ścieżki 4–8 – szczepy P-like pA⁺

M – molecular size marker (pUC19 DNA/MspI enzyme, Fermentas, Litwa); lane 1 – negative control; lanes 2–3 – positive control; lanes 4–8 – P-like pA⁺ strains.

Ryc. 2. Elektroforeza agarozowa produktu PCR genu fibrynolizyny (*sak*)

*Fig. 2. Agarose gel electrophoresis of PCR amplification of staphylokinase gene (*sak*) product*

Fakt występowania wysokiego odsetka fibrynolizynoujemnych gronkowców o biotypie innym niż biotyp ludzki zadecydował o potrzebie zbadania, czy brak wytwarzania fibrynolizyny przez gronkowce biotypu P-like pA⁺ jest cechą różnych szczepów, czy też mamy do czynienia z nieznanym dotychczas klonem, w którym cecha niewytwarzania fibrynolizyny dotyczy jednego szczepu. Aby się o tym przekonać, w dalszej części pracy zastosowano typowanie genetyczne przy użyciu elektroforezy pulsacyjnej (PFGE) oraz sekwencjonowanie genu białka A (*spa*).

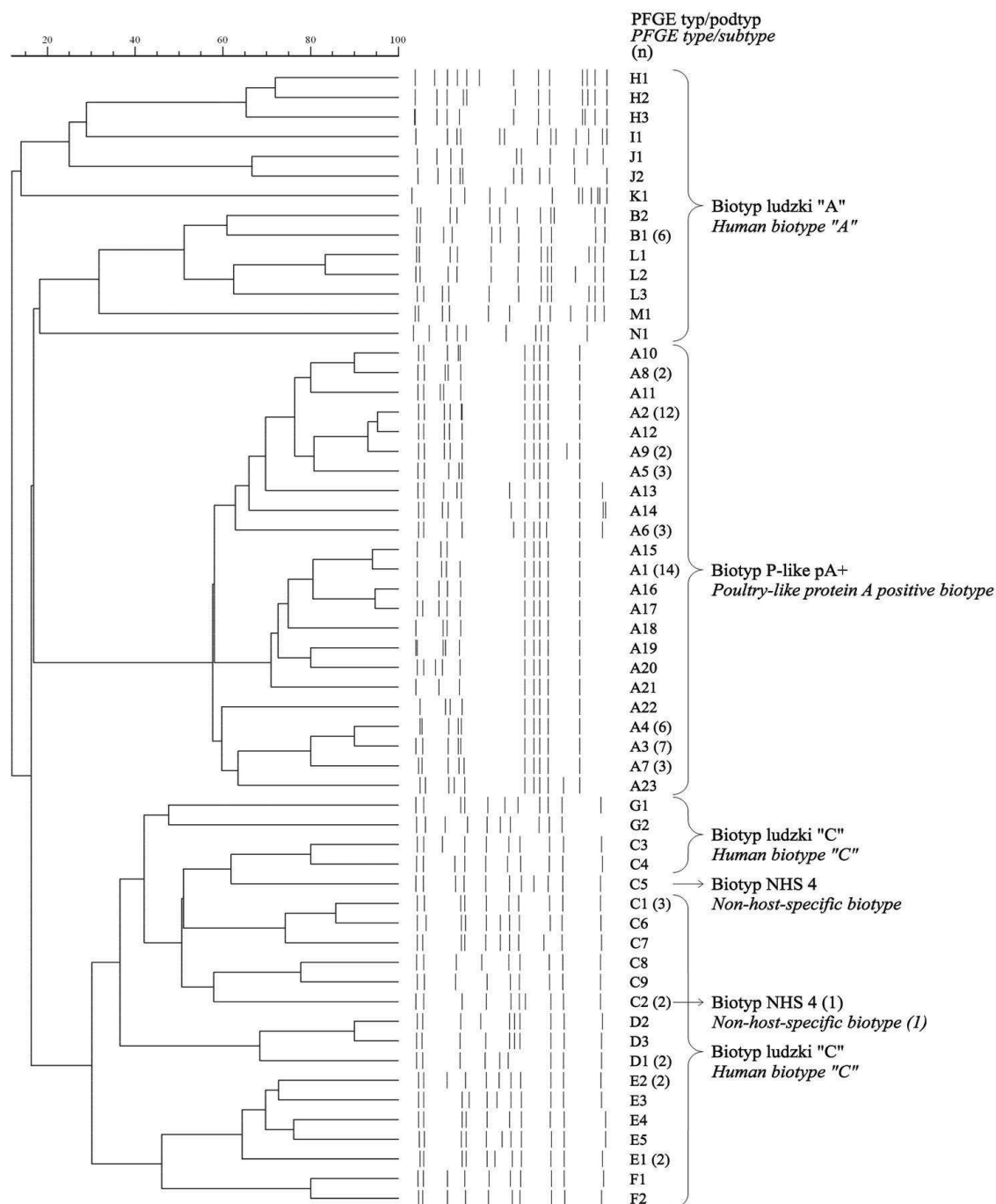
4.1.2. Typowanie genetyczne

4.1.2.1. Typy PFGE

Wyniki typowania genetycznego DNA trawionego enzymem restrykcyjnym *Sma*I (PFGE) w szczepach II grupy fagowej przedstawiono na dendrogramie (rycina 3). Wynika z niego, że badana populacja gronkowców (n=112) wykazuje duże zróżnicowanie genetyczne – wyróżniono 58 podtypów i 14 typów PFGE (PFGE A – N). Typ PFGE-A tworzyła najliczniejsza grupa izolatów (58,9%, n=66) z liczbą 23 różnych podtypów PFGE (PFGE: A1 – A23) i z poziomem podobieństwa na dendrogramie równym i większym 55% (metoda UPGMA, współczynnik Dice'a). Pozostałe typy PFGE były mniej liczne i występowały z częstością od 10,7% (n=12, PFGE-C) do 0,9% (n=1, PFGE – I, K, M i N) – rycina 3, rycina 4.

Na podstawie kryteriów Tenovera i wsp. określających „klon”, jako grupę izolatów wykazujących względem siebie pokrewieństwo i należących do jednego typu PFGE [208] wykazano, że populacja gronkowców biotypu P-like pA⁺ tworzyła jeden klon PFGE-A (n=66) – rycina 3. W odróżnieniu od niej, gronkowce biotypu ludzkiego były zróżnicowane – wykryto wśród nich 13 klonów PFGE z 35 podtypami. Klony PFGE – C, D, E, F i G skupiały izolaty biotypu ludzkiego „C”, podczas gdy klony PFGE – B, H, I, J, K, L, M i N reprezentowane były przez gronkowce biotypu ludzkiego „A”. Należy

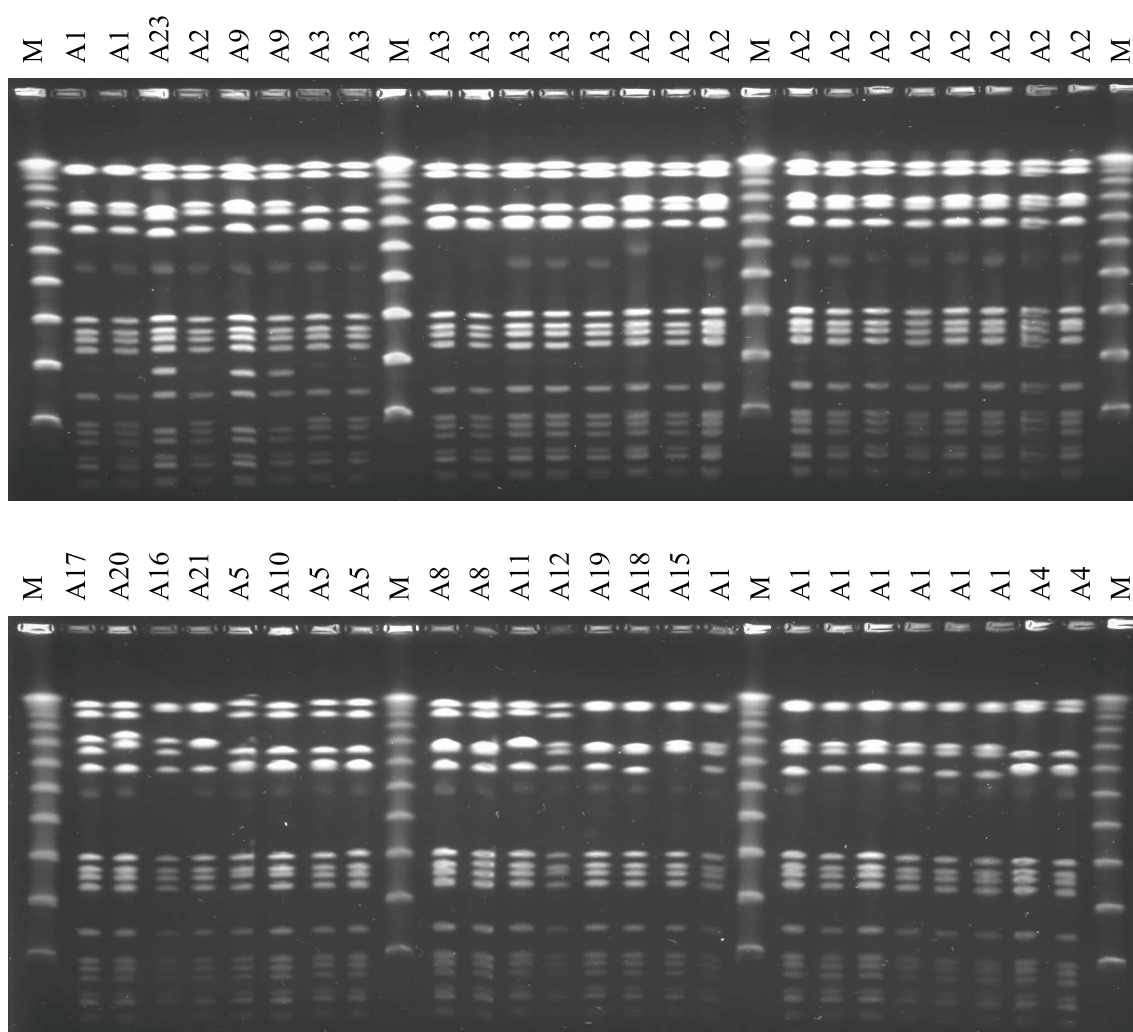
podkreślić, że żaden spośród szczepów biotypu ludzkiego nie należał do klonu reprezentowanego przez szczep P-like pA+.



Poziom podobieństwa został obliczony przy użyciu metody UPGMA oraz współczynnika Dice'a.
The level of genetic similarity was created by UPGMA method and Dice'a coefficient.

Ryc. 3. Dendrogram wzorów PFGE przedstawiający powiązania między 112 izolatami
S. aureus II grupy bakteriofagowej pochodzącymi od ludzi

Fig. 3. Dendrogram containing PFGE patterns of 112 S. aureus of bacteriophage group II isolates from human origin

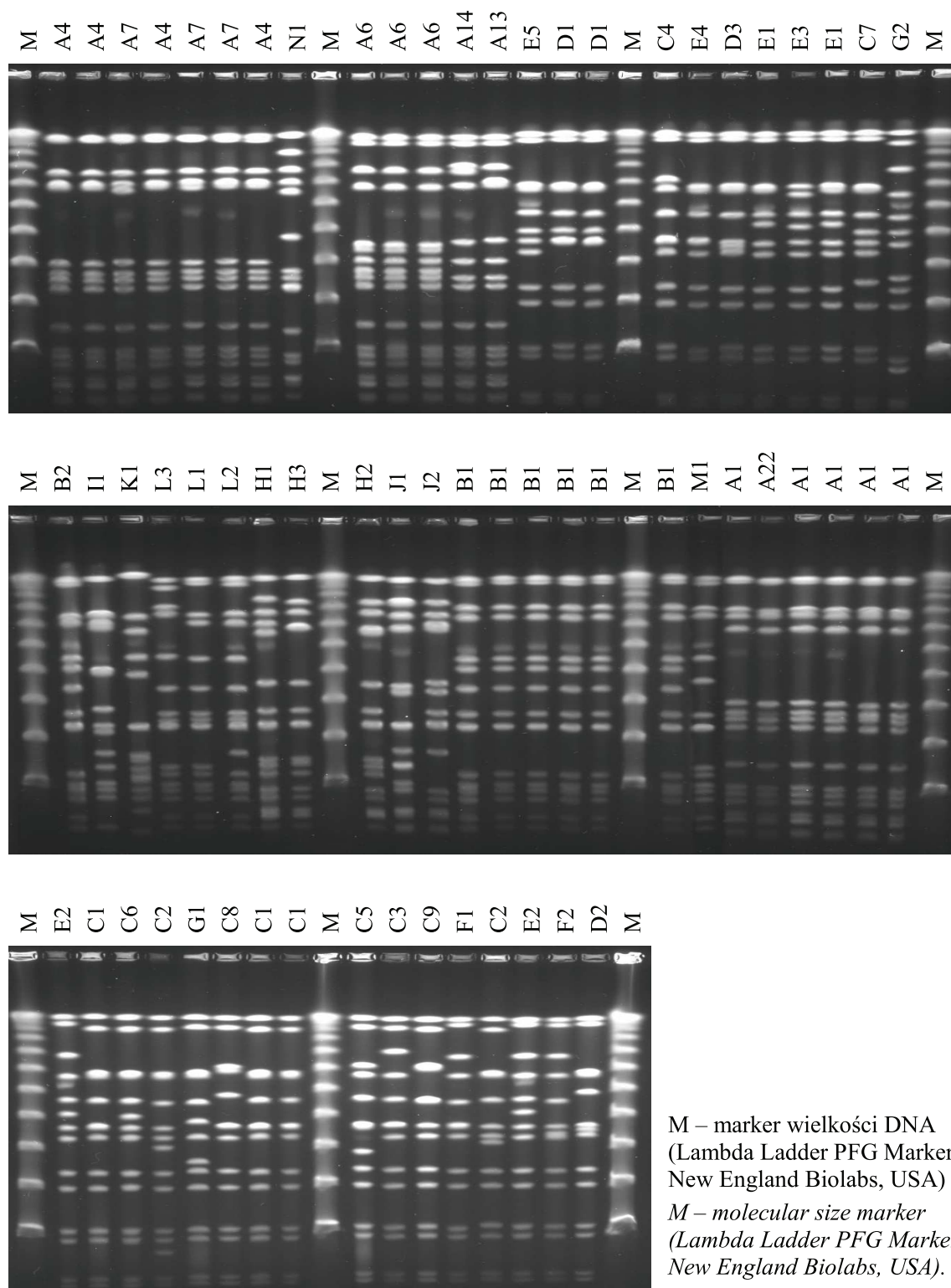


M – marker wielkości DNA (Lambda Ladder PFG Marker, New England Biolabs, USA)

M – molecular size marker (Lambda Ladder PFG Marker, New England Biolabs, USA).

Ryc. 4. Wzory PFGE otrzymane po cięciu enzymem restrykcyjnym *Sma I* DNA 112 gronkowców II grupy fagowej

Fig. 4. PFGE image with the Sma I restriction pattern of DNA from 112 staphylococci of phage group II



Ryc. 4 cd. Wzory PFGE otrzymane po cięciu enzymem restrykcyjnym *Sma I* DNA 112 gronkowców II grupy fagowej

Fig. 4 (continued). PFGE image with the Sma I restriction pattern of DNA from 112 staphylococci of phage group II

Wyniki otrzymane w metodzie PFGE zostały następnie zweryfikowane przy pomocy typowania genu białka A (*spa*). Wybór metody podyktowany był dużą siłą różnicującą, porównywalną z metodą PFGE, oraz przydatność w krótko- i długoterminowych badaniach nad strukturą klonalną szczepów *S. aureus* [129, 130, 139].

4.1.2.2. Typy genu *spa* i kompleksy klonalne (*spa*-CC)

W pierwszym etapie typowania przeprowadzono amplifikację polimorficznego fragmentu X genu *spa* wśród populacji szczepów II grupy fagowej (n=112). Wyniki, z uwzględnieniem poszczególnych klonów (typów) PFGE przedstawiono w tabeli 6.

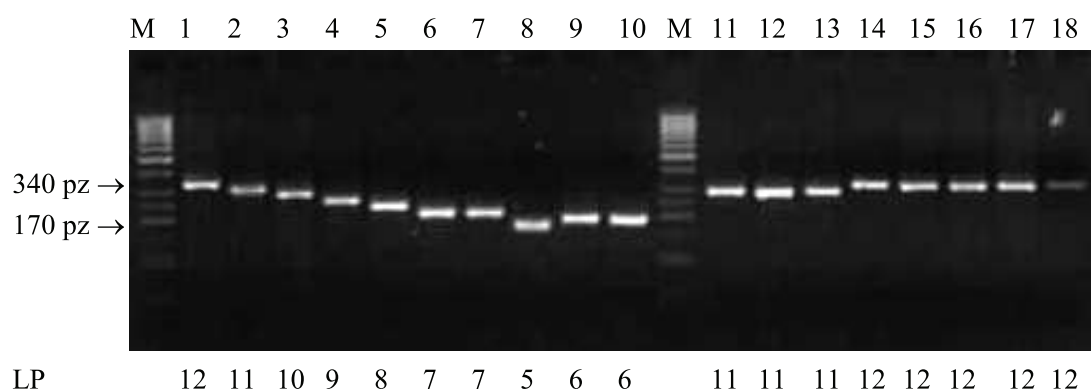
Tabela 6. Wielkości polimorficznego fragmentu X genu *spa* wśród gronkowców II grupy fagowej należących do różnych typów/podtypów PFGE

Table 6. The size of polymorphic X-region of *spa* gene from different PFGE types/subtypes of phage group II staphylococci

Typ/podtyp PFGE <i>PFGE</i> <i>subtype/type</i>	N	Wielkość fragmentu X genu <i>spa</i> * (liczba powtórzeń 24 pz**) <i>Size of X region of spa gene (number of 24 bp repeats)</i>							
		<i>n</i>							
		340 (12)	310 (11)	290 (10)	270 (9)	250 (8)	220 (7)	200 (6)	170 (5)
A1 – A23	66	20	39	5	0	2	0	0	0
B1 – B2	7	0	0	0	0	0	0	2	5
C1 – C9	12	0	0	0	8	4	0	0	0
D1 – D3	4	0	0	0	3	1	0	0	0
E1 – E5	7	0	0	2	5	0	0	0	0
F1 – F2	2	0	0	0	0	2	0	0	0
G1 – G2	2	0	0	0	0	0	2	0	0
H1 – H3	3	0	0	3	0	0	0	0	0
I1	1	0	0	0	0	0	1	0	0
J1 – J2	2	0	0	0	1	0	0	1	0
K1	1	0	0	0	0	0	0	1	0
L1 – L3	3	0	0	0	0	0	0	2	1
M1	1	0	0	0	0	1	0	0	0
N1	1	0	0	0	0	1	0	0	0
Razem	112	20	39	10	17	11	3	6	6
<i>Total</i>	%	17,8	34,8	8,9	15,2	9,8	2,7	5,3	5,3

* par zasad / *base pair*

** według Frenay / *according to Frenay* [59]



LP – liczba powtórzeń fragmentu 24 par zasad, M – marker wielkości DNA (GeneRuler 50 bp DNA Ladder, Fermentas, Litwa); ścieżki 1–3, 11–18 – szczepy PFGE-A; ścieżka 4 – szczep PFGE-E1; ścieżka 5 – szczep PFGE-C1; ścieżka 6 – szczep PFGE-G1; ścieżka 7 – szczep PFGE-I1; ścieżka 8 – szczep PFGE-B1; ścieżka 9 – szczep PFGE-L1; ścieżka 10 – szczep PFGE-B1

LP – the number of 24 base pair repeats, M – molecular size marker (GeneRuler 50 bp DNA Ladder, Fermentas, Litwa); lanes 1–3, 11–18 – PFGE-A strains; lane 4 – PFGE-E1 strain; lane 5 – PFGE-C1 strain; lane 6 – PFGE-G1 strain; lane 7 – PFGE-I1 strain; lane 8 – PFGE-B1 strain; lane 9 – PFGE L1 strain; lane 10 – PFGE-B1 strain

Ryc. 5. Elektroforeza agarozowa produktu PCR regionu X genu *spa*

Fig. 5. Agarose gel electrophoresis of PCR amplification of X region of the *spa* gene product

Wynika z niej, że badane gronkowce wykazywały zróżnicowanie pod względem wielkości amplifikowanego fragmentu X genu *spa*. Najliczniejsze były szczepy dla których produkt amplifikacji wynosił 310 pz (34,8%). Najmniej liczne okazały się gronkowce z fragmentem X genu *spa* równym 220 pz (2,7%).

W obrębie jednego klonu PFGE badane gronkowce dawały zbliżone długości produktu PCR i związaną z tym podobną liczbę powtórzeń fragmentu 24 par zasad. W klonie PFGE-A (n=66) niemal wszystkie izolaty miały produkt wielkości 310 pz lub 340 pz i odpowiednio jednaście (59,1% – 39/66) i dwanaście (33,3% – 20/66) wielokrotności odcinka 24 pz (rycina 5). Należy zaznaczyć, że wymienione wielkości były charakterystyczne dla klonu PFGE-A, gdyż nie pojawiały się one w pozostałych badanych izolatach. Wśród tych ostatnich, tworzących klony: PFGE – C, D, E, F i G, występowały zbliżone wielkości produktu PCR (220 – 270 pz) i liczba powtórzeń (7 – 9).

W drugim etapie typowania przeprowadzono sekwencjonowanie amplifikowanego fragmentu X genu *spa*. Badaniami objęto szczepy II grupy fagowej reprezentujące poszczególne klony PFGE, a w przypadku klonu PFGE-A, poszczególne podtypy (A1 – A23). Wyniki przedstawiono w tabeli 7.

Tabela 7. Typy genu *spa* oraz kompleksy klonalne wyróżnione w obrębie typów/podtypów PFGE gronkowców II grupy bakteriofagowej (n=40)

Table 7. *Spa* types and clonal complexes (*spa*-CC) selected among different PFGE types/subtypes of staphylococci of bacteriophage group II (n=40)

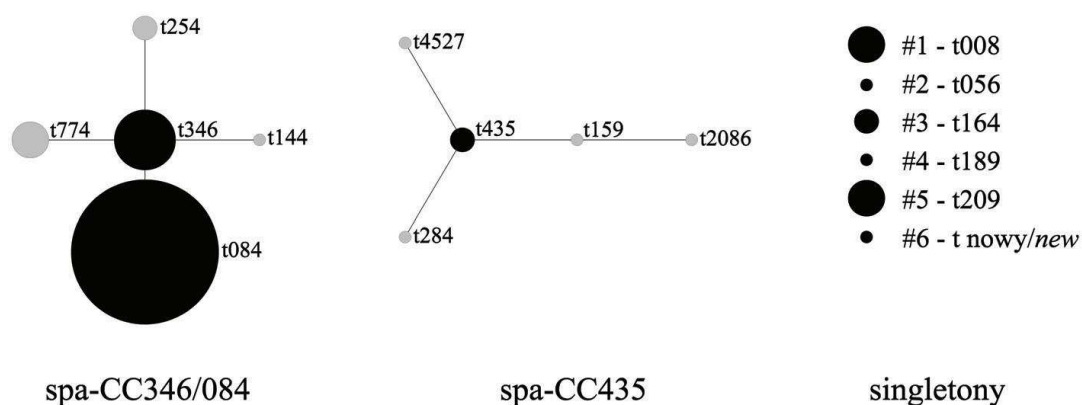
Podtyp PFGE <i>PFGE subtype</i>	<i>n</i>	Typ <i>spa</i> <i>spa type</i>	Szereg powtórzeń <i>Repeat succession*</i>	<i>spa</i> -CC
A1, A2, A3, A7, A11, A12, A14, A16, A19, A20, A22, A23	12	t084	r07 r23 r12 r34 r34 r12 r12 r23 r02 r12 r23	CC346/084
A5, A8, A13, A17, A18	5	t346	r07 r23 r12 r34 r12 r12 r23 r02 r12 r23	
A9, A15	2	t254	r07 r34 r12 r12 r23 r02 r12 r23	
A6	1	t144	r07 r23 r12 r34 r34 r12 r12 r23 r02 r02 r12 r23	
A4, A10, A21	3	t774	r07 r23 r12 r34 r34 r12 r12 r12 r23 r02 r12 r23	
C1	1	t435	r14 r44 r13 r17 r17 r17 r23 r18 r17	CC435
C2	1	t4527	r07 r13 r17 r17 r17 r17 r23 r18 r17	
G1	1	t2086	r14 r44 r13 r12 r17 r17 r17	
F1	1	t284	r14 r44 r13 r17 r17 r23 r18 r17	
E1	1	t159	r14 r44 r13 r12 r17 r17 r23 r18 r17	
D1	1	t435	r14 r44 r13 r17 r17 r17 r23 r18 r17	
H1, H2, H3	3	t008	r11 r19 r12 r21 r17 r34 r24 r34 r22 r25	singleton 1
J1	1	t056	r04 r20 r12 r17 r20 r17 r12 r17 r17	singleton 2
N1, M1	2	t164	r07 r06 r17 r21 r34 r34 r22 r34	singleton 3
K1	1	t189	r07 r23 r12 r21 r17 r34	singleton 4
B1, B2, L1	3	t209	r07 r16 r12 r23 r34	singleton 5
I1	1	nowy <i>new</i>	r07 r20 r12 r34 r34 r12 r12 r23 r02 r12 r23	singleton 6

* typy *spa* oraz sekwencje powtórzeń dostępne w <http://www.ridom.de/spaserver>

* *spa* types and repeat sequence available at <http://www.ridom.de/spaserver>.

W rezultacie przeprowadzonych badań wyróżniono 17 typów *spa*, w tym jeden nowy, nie umieszczony w bazie danych (<http://www.ridom.de/spaserver>). Najczęstszy okazał się typ *spa* t084, który stanowił około 1/3 badanych izolatów (30% – 12/40). Pozostałe typy *spa* pojawiały się rzadziej i obejmowały nie więcej niż pięć izolatów. Wykorzystując algorytm BURP [129,130] określono następnie powiązania klonalne między wyróżnionymi typami genu *spa* wśród badanych gronkowców – tabela 7, rycina 6. Wyróżniono 2 kompleksy klonalne typów genu *spa*: *spa*-CC346/084 i *spa*-CC435, oraz grupę singletonów. Do kompleksu *spa*-CC346/084 należały izolaty reprezentujące klon PFGE – A, podczas gdy kompleks *spa*-CC435 był bardziej zróżnicowany, gdyż skupiał izolaty pochodzące z pięciu innych klonów (PFGE – C, D, E, F i G). Do grupy

singletonów należały izolaty, które nie wykazywały powiązań klonalnych między typami *spa* (spa-CC) i reprezentowały pozostałe klony PFGE (PFGE – B, H, I, J, K, L, M i N).



Wielkość koła jest proporcjonalna do liczby izolatów. Odległość między połączonymi typami *spa* nie zawiera informacji o genetycznym dystansie między nimi. Czarne koła reprezentują grupę „founderów” / *The size of circle is proportional to the number of isolates. The spacing between linked spa types provides no information concerning the genetic distance between them. Black circles represent group „founders” [130].*

Ryc. 6. Klonalne powiązania typów genu *spa* wśród gronkowców II grupy fagowej (n=40) utworzone przy zastosowaniu algorytmu BURP

Fig. 6. Clonal relationships of spa – types of staphylococci from bacteriophage group II (n=40) created with the BURP algorithm

4.1.2.3. Kompleksy klonalne występujące w obrębie biotypów

Dotychczas uzyskane wyniki typowania *spa* wymagają wyjaśnienia, czy istnieje związek między biotypem a przynależnością do wyróżnionych spa-CC kompleksów klonalnych. W tabeli 8 przedstawiono klonalne powiązania typów *spa* (spa-CC) wśród szczepów II grupy fagowej z uwzględnieniem biotypów. Wynika z niej, że w biotypie P-like pA+pojawiają się wyłącznie szczepy kompleksu klonalnego spa-CC346/084, podczas gdy gronkowce biotypu ludzkiego wykazują zróżnicowanie klonalne. Izolaty biotypu ludzkiego, które miały typ wzrostu „C” na podłożu z fioletem krystalicznym, tworzyły jeden kompleks klonalny typów *spa* (spa-CC435). W przeciwieństwie do nich, wśród gronkowców biotypu ludzkiego „A” występowały szczepy nie wykazujące powiązań klonalnych między typami *spa* (singletony).

Tabela 8. Występowanie kompleksów klonalnych (*spa*-CC) w obrębie szczepów biotypu P-like pA⁺ oraz biotypu ludzkiego

Table 8. Occurrence of clonal complexes (spa-CC) among strains of P-like pA⁺ and human biotypes

Biotyp / <i>Biotype</i>	Podtyp PFGE / <i>PFGE subtype</i>	<i>spa</i> -CC
P-like pA ⁺	A1 – A23 (66)*	CC346/084 (23)*
ludzki „C” / <i>human “C”</i>	C1 – C4, C6 – C9 (10)	CC435 (2)
	D1 – D3 (4)	CC435 (1)
	E1 – E5 (7)	CC435 (1)
	F1 – F2 (2)	CC435 (1)
	G1 – G2 (2)	CC435 (1)
ludzki „A” / <i>human “A”</i>	H1 – H3 (3)	singleton #1 (3)
	J1 – J2 (2)	singleton #2 (1)
	M1 (1)	singleton #3 (1)
	N1 (1)	singleton #3 (1)
	K1 (1)	singleton #4 (1)
	B1 – B2 (7)	singleton #5 (2)
	L1 – L3 (3)	singleton #5 (1)
	I1 (1)	singleton #6 (1)
razem / <i>total</i>	110	40

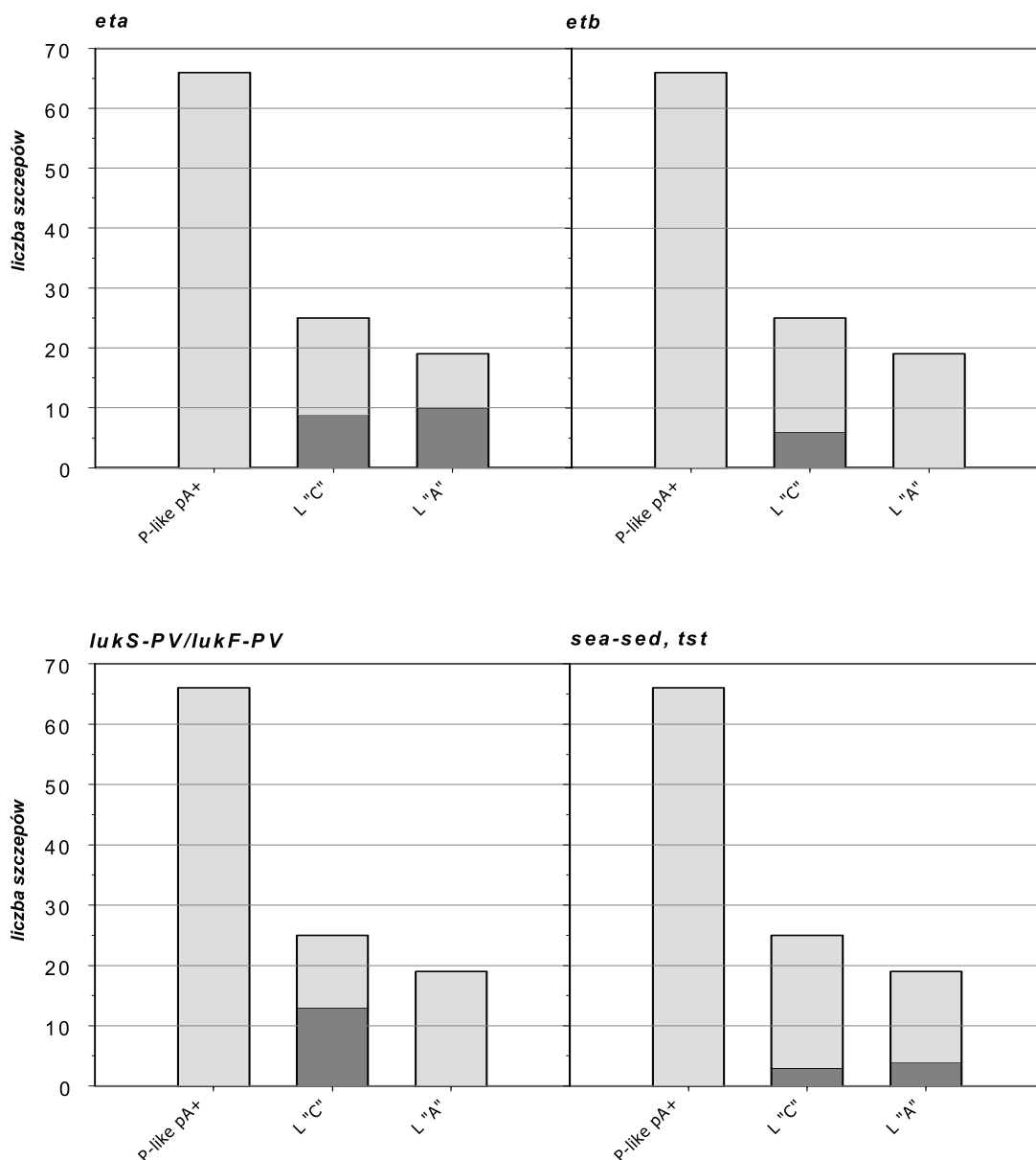
* liczba badanych szczepów / *the number of tested strains.*

Przedstawione dotychczas wyniki badań gronkowców II grupy fagowej wskazują na obecność dwóch głównych, genetycznie odmiennych biotypów: P-like pA⁺ i ludzkiego. Fibrylizynoujemny biotyp P-like okazał się klonem skupiającym izolaty o podobnych wzorach PFGE (A1 – A23), o powiązanych typach genu *spa* w jeden kompleks klonalny (*spa*-CC346/084). W odróżnieniu od biotypu P-like pA⁺, szczepy ludzkie wykazały zróżnicowanie klonalne, gdyż wyróżniono wśród nich szereg klonów PFGE i tylko część z nich – o typie wzrostu „C” na podłożu z fioletem krystalicznym – wykazywała powiązania klonalne typów *spa* (*spa*-CC435). Wśród pozostałych gronkowców ludzkich (typ „A”) takich powiązań nie wykazano (singletony).

Biorąc pod uwagę przedstawione wyniki badań, w dalszej części pracy gronkowce CC346/084 określano jako kompleks klonalny szczepów P-like pA⁺, gronkowce CC435 jako kompleks klonalny szczepów ludzkich L „C”, a grupę singletonów – jako klony ludzkie L „A”.

4.1.3. Porównawcza charakterystyka wyróżnionych kompleksów klonalnych

4.1.3.1. Występowanie genów toksyn



eta, *etb* – geny eksfoliatyn A i B; *lukS-PV/lukF-PV* – geny leukocydyny Panton-Valentina; *tst* – gen toksyny wstrząsu toksycznego-1; *sea*, *seb*, *sec*, *sed* – geny enterotoksyn A, B, C i D

eta, *etb* – genes of exfoliative toxin A and B; *lukS-PV/lukF-PV* – genes of Panton-Valentina leukocidin; *tst* – gene of toxic shock syndrome toxin-1; *sea*, *seb*, *sec*, *sed* – genes of enterotoxins A, B, C and D.

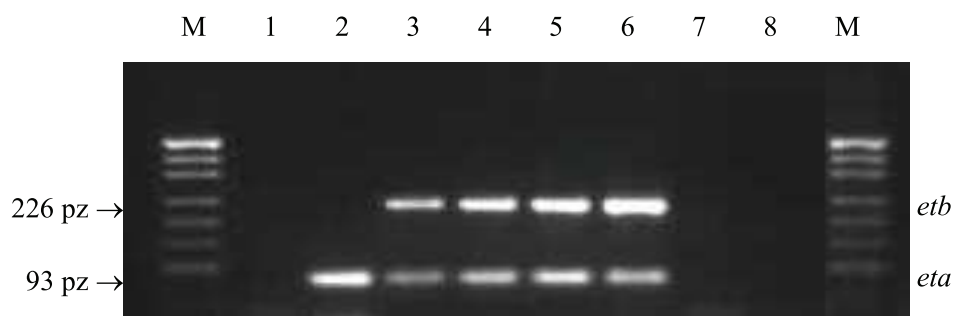
Ryc. 7. Występowanie genów toksyn wśród szczepów *S. aureus* należących do wyróżnionych kompleksów klonalnych

Fig. 7. Occurrence of toxin genes of *S. aureus* strains from detected clonal complexes

Zjadliwość bakterii zależy głównie od zdolności wytwarzania toksyn oraz adhezyn – czynników związanych z pierwszym etapem zakażenia. Jak wykazano w pracy, wszystkie szczepy biotypu P-like pA⁺ nie wytwarzały fibrynolizyny – jednego z podstawowych czynników wirulencji ludzkich gronkowców złocistych [19]. Aby określić możliwości chorobotwórcze szczepów P-like pA⁺ i dowiedzieć się, czy różnią się one pod tym względem od gronkowców ludzkich, zbadano występowanie genów niektórych toksyn związanych z określonym typem zakażenia (*eta*, *etb*, *lukS-PV/lukF-PV*, *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *tst*) [18, 35, 150, 174] i adhezyn gronkowcowych (*ebp*, *cna*, *bbp*, *fib* i *fnbB*).

Na rycinie 7 przedstawiono wyniki oznaczania metodą PCR genów ośmiu toksyn gronkowcowych występujących w obrębie wyróżnionych kompleksów klonalnych. Wynika z niej, że pomiędzy kompleksem klonalnym P-like pA⁺ oraz kompleksem ludzkim L „C” istnieją wyraźne różnice dotyczące rozpowszechnienia genów toksyn, a klony ludzkie z grupy singletonów (L „A”) pod tym względem są podobne do kompleksu L „C”. Podczas gdy w kompleksie klonalnym P-like pA⁺ nie wykryto żadnego z badanych genów, ponad połowa szczepów kompleksu L „C” miała geny leukocydyny Panton-Valentina (*lukS-PV/lukF-PV*, 52% – 13/25; $p < 0,0001$). Na drugim i trzecim miejscu, pod względem częstości występowania genów toksyn, w kompleksie L „C” znalazły się geny eksfoliatyny A (*eta*, 36% – 9/25; $p < 0,0001$) i eksfoliatyny B (*etb*, 24% – 6/25; $p = 0,0002$). W grupie klonów ludzkich L „A” (singletony) przeważały szczepy z genem eksfoliatyny A (*eta*, 52,6% – 10/19) i w porównaniu z kompleksem szczepów P-like pA⁺ była to istotna różnica ($p < 0,0001$). Pozostałe geny toksyn (*sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *tst*) wykryto jedynie w klonach ludzkich (L „C”, L „A”), lecz występowały one z niską częstością.

W tabeli 9 oraz na rycinach 8 – 9 przedstawiono profile genowe toksyn w szczepach należących do wyróżnionych kompleksów klonalnych.



M – marker wielkości DNA (pUC19 DNA/MspI enzyme, Fermentas, Litwa); ścieżka 1 – kontrola ujemna; ścieżka 6 – kontrola dodatnia; ścieżka 2 – szczep grupy singletonów L „A”, ścieżki 3–5 – szczep kompleksu klonalnego L „C”; ścieżki 7–8 – szczepy kompleksu klonalnego P-like pA⁺

M – molecular size marker (pUC19 DNA/MspI enzyme, Fermentas, Litwa); lane 1 – negative control; lane 6, – positive control; lane 2 – strain of singletons group L „A”; lanes 3–5 – strains of L „C” clonal complex; lanes 7–8 – strains of P-like pA⁺ clonal complex.

Ryc. 8. Elektroforeza agarozowa produktów multiplex PCR genów *eta*, *etb*

Fig. 8. Agarose gel electrophoresis of multiplex PCR amplification of *eta*, *etb* gene products



M – marker wielkości DNA (pUC19 DNA/MspI enzyme, Fermentas, Litwa); ścieżka 1 – kontrola dodatnia; ścieżka 4 – kontrola ujemna; ścieżki 2–3, 9–10 – szczepy kompleksu klonalnego L „C”; ścieżki 5–8 – szczepy kompleksu klonalnego P-like pA+

M – molecular size marker (pUC19 DNA/MspI enzyme, Fermentas, Litwa); lane 1 – positive control; lane 4 – negative control; lanes 2–3, 9–10 – strains of L „C” clonal complex; lanes 5–8 – strains of P-like pA+ clonal complex.

Ryc. 9. Elektroforeza agarozowa produktu PCR genu *lukS-PV/lukF-PV*

Fig. 9. Agarose gel electrophoresis of PCR amplification of *lukS-PV/lukF-PV* gene product

Tabela 9. Profile genowe toksyn wśród szczepów *S. aureus* należących do wyróżnionych kompleksów klonalnych

Table 9. Toxin genes patterns of *S. aureus* strains from detected clonal complexes

Profile genowe toksyn <i>Toxin gene patterns</i>	Kompleks klonalny <i>Clonal complex</i> n (%)		
	P-like pA+ (N=66)	L „C” (N=25)	L „A”* (N=19)
<i>lukS-PV/lukF-PV</i>	0	13 (52)	0
<i>eta/etb</i>	0	6 (24)	0
<i>eta</i>	0	3 (12)	10 (52,6)
<i>sea</i>	0	0	2 (10,5)
<i>seb</i>	0	0	1 (5,3)
<i>sec</i>	0	2 (8)	1 (5,3)
<i>tst</i>	0	1 (4)	0
razem / total	0	25 (100)	14 (73,7)

*singletony / singletons.

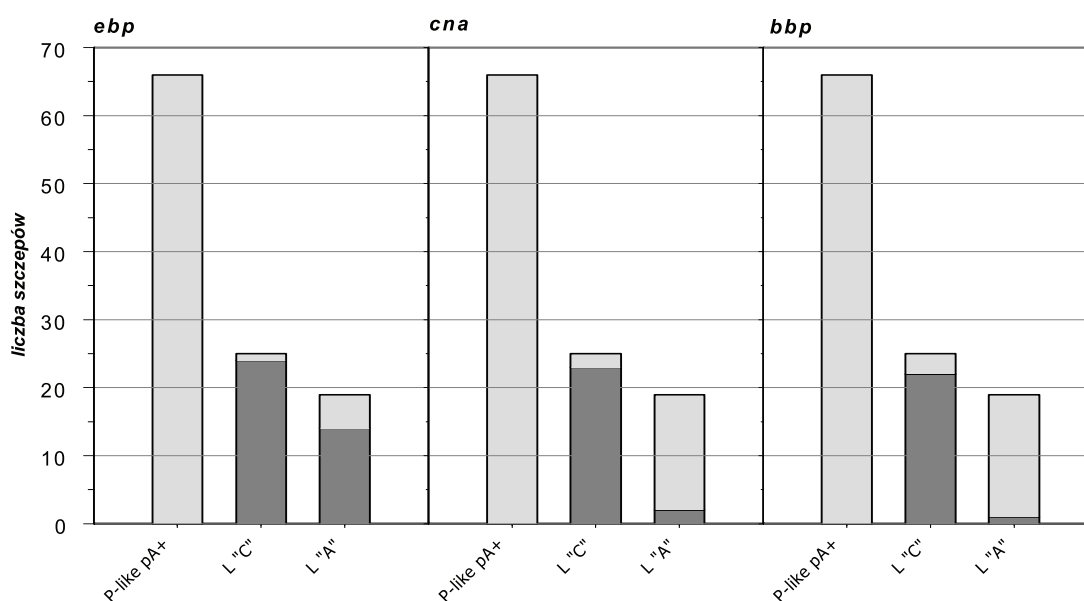
Jak wynika z danych zawartych w tabeli 9, kompleks klonalny szczepów ludzkich L „C” charakteryzował się przynajmniej jednym z poszukiwanych genów toksyn w szczepie (100%) i najczęściej były to szczepy z genem leukocydyny Pantone-Valentine (52%) lub eksfoliatyn A/B (24%) – ryciny 8 – 9. W grupie klonów ludzkich L „A”,

podobnie jak w kompleksie L „C”, większość gronkowców posiadała geny toksyn (73,7%) i przeważały wśród nich szczepy z jednym genem – eksfoliatyny A (52,6%). W kompleksie klonalnym szczepów P-like pA+, ze względu na brak poszukiwanych genów, nie udało się określić profilu toksyn.

Wyniki przedstawione w tej części pracy wskazują, że w porównaniu z gronkowcami ludzkimi (L „C”, L „A”), gronkowce kompleksu klonalnego P-like pA+ nie zawierają genów toksyn, które biorą udział w patomechanizmie zakażeń skóry. Cechą charakterystyczną szczepów ludzkich (L „C”, L „A”) są natomiast geny toksyn: *eta*, *etb*, *lukS-PV/lukF-PV*, biorących udział w powstawaniu określonych zmian skórnych [6, 90].

4.1.3.2. Występowanie genów adhezyn

Na rycinach 10 – 13 przedstawiono występowanie wybranych genów adhezyn wśród szczepów należących do wyróżnionych kompleksów klonalnych. Jak można zauważyć, kompleks klonalny szczepów P-like pA+ różnił się od gronkowców ludzkich (L „C”, L „A”) zarówno częstością występowania genów adhezyn, jak też ich rodzajem.

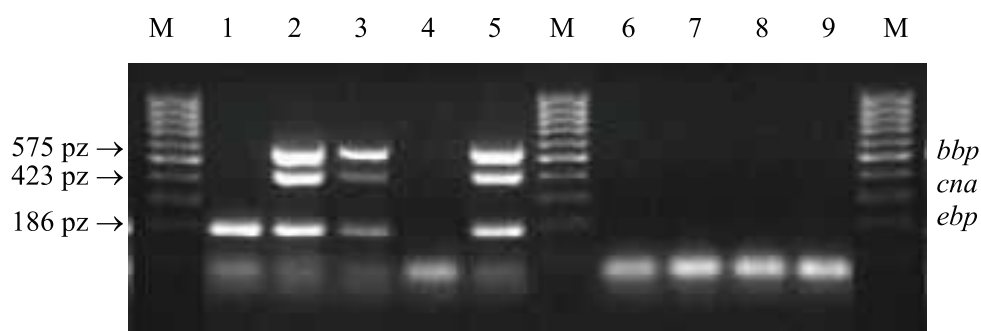


ebp – gen białka wiążącego elastynę; *cna* – gen białka wiążącego kolagen; *bbp* – gen białka wiążącego sialoproteinę kostną

ebp – gene of elastin binding protein; *cna* – gene of kolagen binding protein; *bbp* – gene of bone binding protein.

Ryc. 10. Występowanie genów adhezyn (*ebp*, *cna*, *bbp*) wśród szczepów *S. aureus* należących do wyróżnionych kompleksów klonalnych

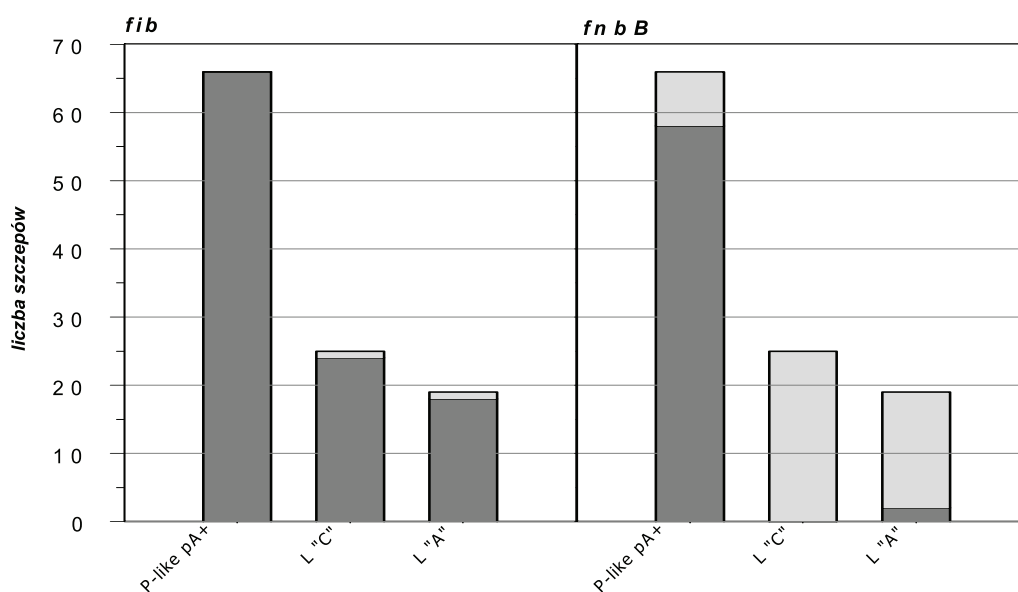
Fig. 10. Occurrence of adhesin genes (*ebp*, *cna*, *bbp*) of *S. aureus* strains from detected clonal complexes



M – marker wielkości DNA (GeneRuler 50 bp DNA Ladder, Fermentas, Litwa); ścieżka 4 – kontrola ujemna; ścieżki 1–3 oraz 5 – szczepy kompleksu klonalnego L “C”; ścieżki 6–9 – szczepy kompleksu klonalnego P-like pA+

M – molecular size marker (GeneRuler 50 bp DNA Ladder, Fermentas, Litwa); lane 4 – negative control; lanes 1–3 and 5 – strains of L “C” clonal complex; lanes 6–9 – strains of P-like pA+ clonal complex.

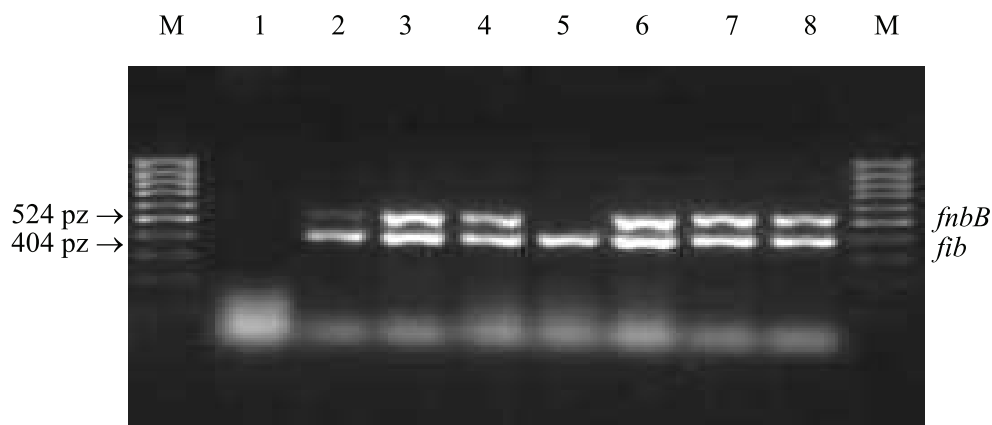
Ryc. 11. Elektroforeza agarozowa produktów multiplex PCR genów: *ebp*, *cna* i *bbp*
Fig. 11. Agarose gel electrophoresis of multiplex PCR amplification of *ebp*, *cna* and *bbp* gene products



fib – białko wiążące fibrynogen; *fnbB* – białko wiążące fibronektynę
fib – fibrinogen binding protein; *fnbB* – fibronectin binding protein.

Ryc. 12. Występowanie genów adhezyn (*fib*, *fnbB*) wśród szczepów *S. aureus* należących do wyróżnionych kompleksów klonalnych

Fig. 12. Occurrence of adhesin genes (*fib*, *fnbB*) of *S. aureus* strains from detected clonal complexes



M – marker wielkości DNA (GeneRuler 50 bp DNA Ladder, Fermentas, Litwa); ścieżka 1 – kontrola ujemna; ścieżki 2–8 – szczepy kompleksu klonalnego P-like pA+

M – molecular size marker (GeneRuler 50 bp DNA Ladder, Fermentas, Litwa); lane 1 – negative control; lanes 2–8 – strains of P-like pA+ clonal complex.

Ryc. 13. Elektroforeza agarozowa produktów multiplex PCR genów *fib* i *fnbB*

Fig. 13. Agarose gel electrophoresis of multiplex PCR amplification of *fib* and *fnbB* gene products

W kompleksie klonalnym L „C” wykryto z wysoką częstością szczepy z genami białek wiążących: elastynę (*ebp*, 96% – 24/25); kolagen (*cna*, 92% – 23/25) oraz sialoproteinę kostną (*bbp*, 88% – 22/25), podczas gdy nie odnaleziono takich genów wśród szczepów kompleksu P-like pA+ ($p < 0,0001$) – ryciny 10 i 11. W kompleksie P-like pA+, w odróżnieniu od L „C”, dominowały gronkowce z genem białka wiążącego fibronektynę (*fnbB*, odpowiednio: 58/66 i 0/25; $p < 0,0001$) – ryciny 12 i 13. Klony ludzkie L „A” zajmowały stanowisko pośrednie. Istotne różnice między nimi a szczepami P-like pA+ dotyczyły genów: *ebp* oraz *fnbB*. Gronkowce L „A”, w przeciwieństwie do P-like pA+, posiadały w większości gen białka wiążącego elastynę (*ebp*, odpowiednio: 14/19 i 0/66; $p < 0,0001$) i nie wykryto u nich genu białka wiążącego fibronektynę (*fnbB*, odpowiednio: 0/19 i 58/66; $p < 0,0001$).

Wspólną właściwością porównywanych grup szczepów była jedynie obecność genu kodującego białko wiążące fibrynogen (*fib*). Wspomniany gen dominował w szczepach kompleksu klonalnego P-like pA+ (100%) i również w szczepach ludzkich: L „C” (96%) i L „A” (94,7%).

Analiza profili genowych adhezyn (tabela 10) wykazała przewagę szczepów z kombinacją dwóch genów: *fib*, *fnbB* (87,9%) w kompleksie klonalnym P-like pA+. W odróżnieniu od nich, wśród gronkowców ludzkich kompleksu klonalnego L „C” wykryto aż 88% szczepów z czterema genami adhezyn (*fib*, *ebp*, *cna*, *bbp*). W grupie gronkowców L „A” występowały różne kombinacje genów adhezyn, lecz ich liczba zazwyczaj nie przekraczała dwóch genów na szczep (89,6%).

Tabela 10. Profile genowe adhezyn wśród szczepów *S. aureus* należących do wyróżnionych kompleksów klonalnych

Table 10. Adhesin genes patterns of *S. aureus* strains from detected clonal complexes

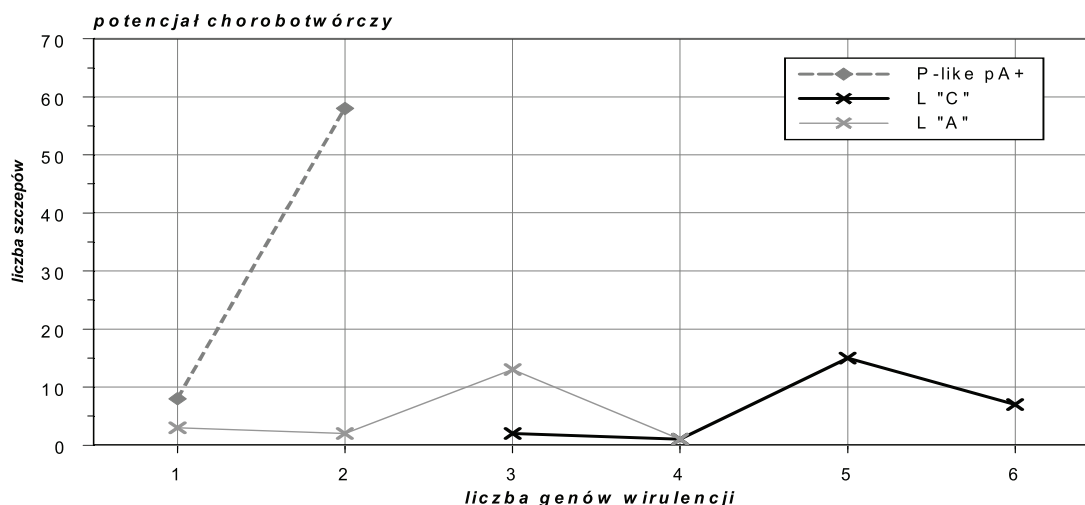
Profile genowe adhezyn <i>Adhesin gene patterns</i>	Kompleks klonalny <i>Clonal complex</i> n (%)		
	P-like pA+ (N=66)	L „C” (N=25)	L „A” [*] (N=19)
<i>fib</i>	8 (12,1)	0	3 (15,7)
<i>fib, fnbB</i>	58 (87,9)	0	2 (10,5)
<i>fib, ebp</i>	0	1 (4)	11 (57,9)
<i>fib, cna</i>	0	1 (4)	0
<i>fib, ebp, bbp</i>	0	0	1 (5,2)
<i>fib, ebp, cna</i>	0	0	1 (5,2)
<i>fib, ebp, cna, bbp</i>	0	22 (88)	0
<i>ebp, cna</i>	0	0	1 (5,2)
<i>ebp</i>	0	1 (4)	0

^{*}singletons / *singletons*.

Przedstawione wyniki mogą wskazywać na różnice w mechanizmie adherencji między szczepami kompleksu klonalnego P-like pA+ i kompleksu klonalnego szczepów ludzkich (L „C”). Gronkowce L „C”, dzięki posiadaniu genów *bbp* i *cna* mogą produkować adhezyjny wiążący się ze sialoproteiną kostną i kolagenem – białkami występującymi głównie w tkance kostnej i stawach [78, 166, 213]. W przeciwieństwie do nich, w szczepach P-like pA+ wykryto gen białka wiążącego fibronektynę (*fnbB*) – czynnika szeroko rozpowszechnionego w różnych miejscach naszego organizmu [57].

4.1.3.3. Potencjał chorobotwórczy

W tej części pracy poddano ocenie potencjał chorobotwórczy szczepów *S. aureus* II grupy fagowej, który według van Leeuwen i wsp., określa liczba genów wirulencji przypadających na szczep [117]. Wyniki uzyskane dla genów toksyn i adhezyn, z uwzględnieniem kompleksów klonalnych przedstawiono na rycinie 14.



Ryc. 14. Potencjał chorobotwórczy szczepów *S. aureus* należących do wyróżnionych kompleksów klonalnych

*Fig. 14. Virulence potential of *S. aureus* strains from detected clonal complexes*

Jak można zauważyć na wykresie, kompleks klonalny P-like pA+ posiadał szczepy z niższym potencjałem chorobotwórczym w porównaniu z kompleksem ludzkim L „C”. Podczas gdy wśród szczepów P-like pA+ dominowały gronkowce z kombinacją jedynie dwóch genów wirulencji (87,9% – 58/66), w kompleksie klonalnym szczepów ludzkich L „C” przeważały gronkowce z pięcioma (60% – 15/25) i sześcioma (32% – 8/25) genami wirulencji. Klony ludzkie L „A” zajmowały stanowisko pośrednie, gdyż większość z nich posiadała trzy geny wirulencji (68,4% – 13/19). Jedynie 10,5% szczepów L „A” miało 2 geny wirulencji.

Wyniki przeprowadzonej analizy są podstawą do wyciągnięcia wniosku o różnicach w potencjale chorobotwórczym i w mechanizmach patogennego działania gronkowców P-like pA+ oraz szczepów ludzkich (L „C” i L „A”). Wyższy potencjał chorobotwórczy mają gronkowce ludzkie (L „C”, L „A”). Złożyły się na niego geny toksyn wywołujących zmiany skórne oraz geny adhezyn związanych z innymi postaciami zakażeń. Gronkowce P-like pA+ okazały się grupą o niższym potencjale chorobotwórczym. Nie wykryto u nich genów toksyn i wykazano obecność genów adhezyn dla białek szeroko rozpowszechnionych w naszym organizmie.

4.1.3.4. Właściwości biochemiczne i wytwarzanie lipazy

W tej części pracy poddano badaniu właściwości fenotypowe szczepów II grupy fagowej należących do wyróżnionych kompleksów klonalnych.

Analizę właściwości biochemicznych przeprowadzono przy zastosowaniu testu Api ID32 Staph i przedstawiono w tabeli 11.

Tabela 11. Właściwości biochemiczne szczepów *S. aureus* z wyróżnionych kompleksów klonalnych określone przy zastosowaniu testu Api ID 32 Staph

Table 11. Biochemical properties of *S. aureus* strains from detected clonal complexes determined in API ID 32 Staph test

Kompleks klonalny <i>Clonal complex</i>	N	Reakcje dodatnie / <i>Positive reaction</i> n (%)						
		ADH	LAC	PyrA	NOVO	RD ¹⁾	RU ²⁾	LIP ³⁾
P-like pA+	66	13 (19,7)	1 (1,5)	8 (12,1)	46 (69,7)	66 (100)	66 (100)	22 (33,3)
L „C”	25	25 (100)	24 (96)	4 (16)	17 (68)	25 (100)	25 (100)	14 (56)
L „A”*	19	16 (84,2)	19 (100)	6 (26,3)	16 (84,2)	19 (100)	19 (100)	9 (47,4)

ADH – dihydrolaza argininy / *arginine dihydrolase*, LAC – rozkład laktozy / *fermentation lactose*, PyrA – arylamidaza pyrrolidonylu / *pyrrolidonyl arylamidase*, NOVO – oporność na nowobiocynę / *novobiocin resistance*.

¹⁾ pozostałe reakcje dodatnie / *other positive reactions*: URE, PAL, GLU, FRU, MNE, MAL, TRE, MAN, SAC, NAG, TUR, NIT, VP; ²⁾ pozostałe reakcje ujemne / *other negative tests*: ODC, ArgA, βGUR, RAF, RIB, CEL, ARA, ESC, βGAL. ³⁾ lipaza, cecha badana dodatkowo, nie objęta testem Api ID32 Staph/ *lipase, the property additionally tested, without Api ID32 Staph*; * singletony / *singletons*.

Pogrubione liczby oznaczają istotne statystycznie różnice we właściwościach między szczepami P-like pA+ a pozostałymi grupami szczepów / *Bold letters indicate the significance of differences in properties between P-like pA+ strains and other groups of strains*.

Spśród badanych cech biochemicznych, rozkład laktozy i wytwarzanie dihydrolazy argininy, miały znaczenie różnicujące w porównywanych grupach szczepów. Kompleks klonalny szczepów P-like pA+ nie rozkładał laktozy (1,5%) i zazwyczaj nie wytwarzał dihydrolazy argininy (19,7%). W kompleksie klonalnym szczepów ludzkich L „C” występowało zjawisko odwrotne. Większość z nich rozkładała laktozę (96%, $p < 0,0001$) i wytwarzała wymieniony wcześniej enzym (100%; $p < 0,0001$). Gronkowce ludzkie L „A” przypominały pod względem omawianych właściwości kompleks L „C”. Pozostałe cechy biochemiczne objęte testem Api ID 32 Staph, a także właściwości lipolityczne występowały w porównywanych grupach szczepów z podobną częstością.

4.1.3.5. Wrażliwość na bakteriofagi

Analizę wrażliwości na fagi zestawu podstawowego z uwzględnieniem wyróżnionych kompleksów klonalnych przedstawiono w tabelach 12 a i 12 b. Wynika z nich, że gronkowce porównywanych grup były lizowane z podobną częstością przez poszczególne fagi II grupy. Jedynym wyjątkiem był fag 71, który dawał stosunkowo więcej reakcji dodatnich ze szczepami ludzkimi kompleksu klonalnego L „C” (60%), niż kompleksu P-like pA+ (6,1%, $p < 0,0001$). Podobną prawidłowość zauważono w szczepach grupy L „A” (52,6%, $p < 0,0001$). Reakcje dodatnie z fagami pozostałych grup były słabe dotyczyły zarówno gronkowców P-like pA+ jak też szczepów ludzkich (L „C”, L „A”)

lecz występowały wyłącznie podczas typowania przeprowadzonego w 100×RTD i obejmowały one pojedyncze szczepy (tabela 12 b).

Tabela 12. Wrażliwość szczepów *S. aureus* z wyróżnionych kompleksów klonalnych na fagi podstawowego zestawu

Table 12. Susceptibility of *S. aureus* strains from detected clonal complexes to the phages from international bacteriophage set

a – fagi II grupy / phages of group II

Kompleks klonalny <i>Clonal complex</i>	N	Fagi / Phages n (%)			
		3A	3C	55	71
P-like pA+	66	3 (4,5)	50 (75,7)	36 (54,6)	4 (6,1)
L „C”	25	3 (12)	13 (52)	13 (52)	15 (60)
L „A”*	19	3 (15,8)	14 (73,7)	6 (31,6)	10 (52,6)

b – fagi z pozostałych grup / phages of other groups

Kompleks klonalny <i>Clonal complex</i>	N	Fagi / <i>Phages</i> ¹⁾ n (%)									PF ²⁾
		I grupa/ <i>group I</i>			III grupa / <i>group II</i>						
		52	52A	80	6	42E	47	53	75	83A	
P-like pA+	66	0	0	0	2 (3)	1 (1,5)	0	0	2 (3)	0	0
L “C”	25	2 (8)	3 (12)	1 (4)	0	0	0	0	0	0	0
L “A”*	19	0	0	0	1 (5,2)	1 (5,2)	1 (5,2)	1 (5,2)	1 (5,2)	1 (5,2)	0

¹⁾ słabe reakcje z fagami w 100×RTD / weak reactions with phages at 100×RTD;

²⁾ pozostałe fagi / other phages: 29, 79, 81, 54, 77, 84, 85, 94, 95, 96; *singletons / singletons .

Pogrubiłe liczby oznaczają istotne statystycznie różnice we właściwościach między szczepami P-like pA+ a pozostałymi grupami szczepów / Bold letters indicate the significance of differences in properties between P-like pA+ strains and other groups of strains.

Zróznicowana wrażliwość gronkowców na faga 71 w porównywanych grupach znalazła odbicie we wzorach fagowych – tabela 13. W kompleksie klonalnym szczepów ludzkich L „C” dominowały wzory zawierające faga 71 (60%), głównie z typem „71” (28%). Wśród gronkowców P-like pA+ wzory z fagiem 71 występowały rzadko (6%, $p < 0,0001$), a typ „71” – tylko w jednym szczepie (1,5%, $p = 0,0003$). Wzory bez faga 71 (3C, 3C/55 oraz 55) przeważały w kompleksie P-like pA+ (89,5%). Gronkowce kompleksu L „C” wyraźnie różniły się pod tym względem, gdyż wzory te pojawiały się tu znacznie rzadziej (37%, $p < 0,0001$). Szczepy L „A” były pod względem częstości występowania wzorów fagowych bliskie szczepom kompleksu L „C”.

Tabela 13. Wzory fagowe szczepów *S. aureus* należących do wyróżnionych kompleksów klonalnychTable 13. Phage patterns of *S. aureus* strains from detected clonal complexes

Kompleks klonalny <i>Clonal complex</i>	N	Wzory fagowe / <i>Phage patterns</i> n (%)								
		3C/71	71	3A/55/71	55/71	3C/55/71	3C	3C/55	55	3A/3C
P-like pA+	66	0	1 (1,5)	0	0	3 (4,5)	26 (39,4)	18 (27,3)	15 (22,7)	3 (4,5)
L "C"	25	1 (4)	7 (28)	4 (16)	3 (12)	0	4 (16)	5 (20)	0	1 (4)
L "A"*	19	8 (42,1)	1 (5,2)	1 (5,2)	0	0	0	3 (15,8)	2 (10,4)	5 (26,3)

* singletony / *singletons*.

4.1.3.6. Oporność na antybiotyki

W tabeli 14 przedstawiono wyniki badania oporności na antybiotyki w szczepach należących do wyróżnionych kompleksów klonalnych.

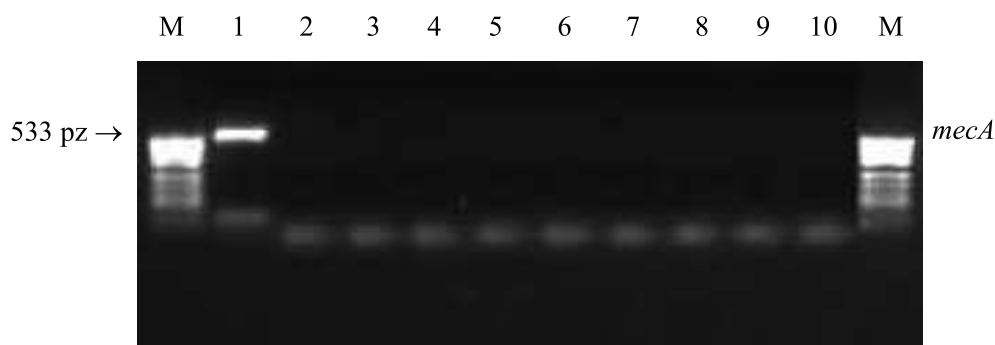
Tabela 14. Oporność na antybiotyki szczepów *S. aureus* należących do wyróżnionych kompleksów klonalnychTable 14. Antimicrobial resistance of *S. aureus* strains from detected clonal complexes

Kompleks klonalny <i>Clonal complex</i>	N	Antybiotyki / <i>Antibiotics</i> Szczepy odporne / <i>Resistant strains</i> n (%)					
		Pe	T	E	CC	C	Inne <i>Other</i> ¹⁾
P-like pA+	66	54 (81,8)	33 (50)	4 (6,1)	3 (4,5)	1 (1,5)	0
L "C"	25	24 (96)	5 (20)	5 (20)	3 (12)	0	0
L "A"*	19	17 (89,5)	1 (5,2)	8 (42,1)	1 (5,2)	0	0
Razem / <i>Total</i>	110	95 (86,4)	39 (35,4)	17 (15,4)	7 (6,4)	1 (0,9)	0

Pe – penicylina / *penicillin*, T – tetracyklina / *tetracyclin*, E – erytromycyna / *erythromycin*, CC – klindamycyna / *clindamycin*, C – chloramfenikol / *chloramphenicol*;

¹⁾ pozostałe antybiotyki (materiał i metody) / *other antibiotics (materials and methods)*; * singletony / *singletons*. Pogrubione liczby oznaczają istotne statystycznie różnice we właściwościach między szczepami P-like pA+ a pozostałymi grupami szczepów / *Bold letters indicate the significance of differences in properties between P-like pA+ strains and other groups of strains*.

Z zestawienia wynika, że w II grupie fagowej przeważają szczepy odporne na penicylinę (86,4%) czy tetracyklinę (35,4%). Oporność na pozostałe leki dotyczyła jedynie erytromycyny (E), klindamycyny (CC) oraz chloramfenikolu (C) i występowała z niższą częstością (15,4% – 0,9%). W II grupie fagowej nie wykryto szczepów opornych na metycylinę zarówno w metodzie dyfuzyjno-krażkowej, jak też w metodzie PCR (rycina 15). Biorąc pod uwagę porównywane w pracy grupy szczepów można stwierdzić, że różnią się one opornością na tetracyklinę (tabela 14). Podczas gdy połowa gronkowców kompleksu klonalnego P-like pA+ była niewrażliwa na tetracyklinę (50%), szczepy odporne na ten lek w kompleksie ludzkim L „C” występowały znacznie rzadziej (20%, $p=0,0162$). Szczepy ludzkie L „A” rzadko były odporne na tetracyklinę (5,2%), czym różniły się istotnie od gronkowców P-like pA+ ($p=0,0003$), ale wykazywały w przeciwieństwie do nich oporność na erytromycynę (42,1% i 6,1%, $p=0,0004$). Konstytutywna oporność typu MLS_B występowała jedynie w kompleksie L „C” i dotyczyła jednego szczepu (4% – 1/25). Indukcyjny mechanizm oporności typu MLS_B odnotowano we wszystkich porównywanych grupach szczepów: P-like pA+ (4,5% – 3/66), L „C” (8% – 2/25) oraz w grupie L „A” (5,2% – 1/19).



M – marker wielkości DNA (pUC19 DNA/MspI enzyme, Fermentas, Litwa); ścieżka 1 – kontrola dodatnia; ścieżka 2 – kontrola ujemna; ścieżki 3–10 – badane szczepy *S. aureus* II grupy fagowej
 M – molecular size marker (pUC19 DNA/MspI enzyme, Fermentas, Litwa); lane 1 – positive control; lane 2 – negative control; lanes 3–10 – *S. aureus* tested strains of phage group II.

Ryc. 15. Elektroforeza agarozowa produktu PCR genu *mecA*

Fig. 15. Agarose gel electrophoresis of PCR amplification of *mecA* gene product

Tabela 15 przedstawia profile oporności na antybiotyki z uwzględnieniem kompleksów klonalnych. Wynika z niej, że wśród gronkowców II grupy fagowej nie zauważono szczepów wielolekoopornych (> 3 antybiotyków). W porównywanych kompleksach były szczepy z podobnymi profilami oporności, lecz różniły się one częstością ich występowania. W kompleksie klonalnym P-like pA+ przeważały szczepy odporne jednocześnie na 2 antybiotyki: penicylinę i tetracyklinę (Pe T, 39,4%), podczas gdy wśród szczepów kompleksu L „C” profil taki pojawiał się rzadko (16%, $p=0,0454$). Gronkowce grupy L „A” w większości były odporne jednocześnie na penicylinę i erytromycynę (Pe E, 36,9%), za to wzór ten pojawił się tylko w jednym szczepie kompleksu P-like

pA+ (1,5%, p=0,0001). Pozostałe profile oporności oraz szczepy wrażliwe na wszystkie badane antybiotyki występowały z podobną częstością w porównywanych grupach szczepów.

Tabela 15. Profile oporności na antybiotyki szczepów *S. aureus* należących do wyróżnionych kompleksów klonalnych

Table 15. Antibiotic resistance patterns of *S. aureus* strains from detected clonal complexes

Kompleks klonalny <i>Clonal complex</i>	N	Profile lekooporności / <i>Antibiotic resistance patterns</i> n (%)							
		Pe	Pe T	Pe E	T	Pe T E	Pe E CC	C	W ¹⁾
P-like pA+	66	24 (36,4)	26 (39,4)	1 (1,5)	7 (10,6)	0	3 (4,5)	1 (1,5)	5 (7,6)
L "C"	25	15 (60)	4 (16)	1 (4)	0	1 (4)	3 (12)	0	1 (4)
L "A"*	19	8 (42,1)	1 (5,2)	7 (36,9)	0	0	1 (5,2)	0	2 (10,5)

¹⁾ szczepy wrażliwe na wszystkie badane w pracy antybiotyki / *the strains sensitive to all of antibiotics used in this study*; *singletony / *singletons*.

Pogrubione liczby oznaczają istotne statystycznie różnice we właściwościach między szczepami P-like pA+ a pozostałymi grupami szczepów / *Bold letters indicate the significance of differences in properties between P-like pA+ strains and other groups of strains*.

Częste występowanie oporności na tetracyklinę wśród szczepów P-like pA+ zadecydowało o potrzebie zbadania stopnia oporności na ten lek oraz na inne antybiotyki z grupy tetracyklin. Oceny dokonano w oparciu o wartości MIC tetracykliny oraz o wyniki testu 2 krążków (tabele: 16 – 17).

Dane zawarte w tabeli 16 wykazały, że dla większości opornych na tetracyklinę szczepów P-like pA+ wartości MIC tetracykliny były niskie i wynosiły 32 mg/l (97%). W kompleksie klonalnym szczepów ludzkich L „C” – podobnie jak w poprzedniej grupie gronkowców – przeważały szczepy o niskiej wartości MIC tetracykliny (60%).

Tabela 16. Wartości MIC tetracykliny dla szczepów *S. aureus* opornych na tetracyklinę

Table 16. MIC value of tetracycline of tetracycline-resistant *S. aureus* strains

Kompleks klonalny <i>Clonal complex</i>	N	MIC (mg/l) n (%)			
		16	32	64	128
P-like pA+	33	0	32 (97)	1 (3)	0
L "C"	5	0	3 (60)	2 (40)	0
L "A"*	1	0	1 (100)	0	0

*singletony / *singletons*.

Wyniki testu 2 krążków dla szczepów opornych na tetracyklinę przedstawiono w tabeli 17. Wynika z niej, że wszystkie oporne na tetracyklinę szczepy II grupy fagowej były wrażliwe na minocyklinę. Świadczy o tym wielkość strefy zahamowania wzrostu wokół krążka z minocykliną i brak jej ścięcia od strony krążka z tetracykliną [212].

Tabela 17. Wyniki testu 2 krążków dla szczepów *S. aureus* opornych na tetracyklinę

Table 17. The results of double disc test of tetracycline-resistant *S. aureus* strains

Kompleks klonalny <i>Clonal complex</i>	Strefa zahamowania wzrostu <i>Inhibition zone diameter (mm)</i>			Kształt strefy <i>Shape of zone</i>
	T 30 µg	N	M 30 µg	
			zakres / <i>range</i>	
P-like pA ⁺	9 (R)*	6	27-34 (S)*	okragła / <i>circular</i>
	10 (R)	18	29-34 (S)	okragła
	12 (R)	13	31-34 (S)	okragła
L „C”	8 (R)	2	22 (S)	okragła
	9 (R)	3	28-29 (S)	okragła
L „A”**	10 (R)	1	29 (S)	okragła

T – tetracyklina / *tetracycline*; M – minocyklina / *minocycline*; R – oporny / *resistant*, S – wrażliwy / *sensitive*; * według CLSI / in accordance with CLSI [32]; **singletony / *singletons*.

Przedstawione wyniki badań oporności na antybiotyki wśród gronkowców II grupy fagowej wykazały niewielkie różnice między porównywanymi grupami. W większości przypadków takie same profile oporności na leki odnotowano zarówno w kompleksie klonalnym szczepów P-like pA⁺ jak też w szczepach ludzkich L „C” i L „A”, a istotne różnice dotyczyły jedynie częstości ich występowania.

4.1.4. Występowanie szczepów P-like pA⁺ w materiałach klinicznych

W tej części pracy przeprowadzono analizę częstości występowania szczepów P-like pA⁺ w różnych materiałach klinicznych – tabela 18 a i 18 b.

Tabela.18. Występowanie szczepów *S. aureus* z poszczególnych kompleksów klonalnych w różnych materiałach klinicznych pochodzących od chorych i od nosicieli

Table 18. Occurrence of *S. aureus* strains from particular clonal complexes within various clinical samples from patients with symptoms of infection and the carriers

a – miejsce izolacji / specimen source

Miejsce izolacji <i>Specimen source</i>	N	Kompleks klonalny <i>Clonal complex</i> n (%)		
		P-like pA+	L „C”	L „A”*
nosiciele <i>carriers</i> ¹⁾	29	19 (65,5)	4 (13,8)	6 (20,7)
zakażenia skóry <i>skin infection</i> ²⁾	24	6 (25)	11 (45,8)	7 (29,2)
rany <i>wounds</i>	23	12 (52,2)	8 (34,8)	3 (12,9)
drogi oddechowe <i>respiratory tract</i> ³⁾	22	19 (86,4)	1 (4,5)	2 (9)
krew <i>blood</i>	4	4 (100)	0	0
inne <i>other</i> ⁴⁾	8	6 (75)	1 (12,5)	1 (12,5)

¹⁾ wymazy z nosa / *nasal swabs*;

²⁾ ropa / *pus*, wymazy ze zmian skórnych / *swabs from skin lesions*;

³⁾ plwocina / *sputum*, treść oskrzeli / *bronchial fluid*, gardło / *throat*;

⁴⁾ wymazy ze spojówki, odbytu, dróg rodnych, przetoki / *swabs from conjunctiva, rectum, genital tract, fistula*

* singletony / *singletons*.

b – zakażenia skóry / *skin infection*

Typ zakażenia <i>Type of infection</i>	N	Kompleks klonalny <i>Clonal complex</i> n (%)		
		P-like pA+	L „C”	L „A”
zespół oparzonej skóry <i>scalded skin syndrom</i>	4	0	0	4 (100)
czyrączność <i>furunculus</i>	11	3 (27,3)	8 (72,7)	0
Niezidentyfikowane zmiany skórne <i>non-identified skin infection</i>	9	3 (33,3)	3 (33,3)	3 (33,3)

Z danych zawartych w tabeli 18 a wynika, że gronkowce kompleksu P-like pA+ izolowano z różnych materiałów klinicznych z wysoką częstością i to zarówno od ludzi

chorych jak i nosicieli (od 86,4% – drogi oddechowe do 25% – zakażenia skóry; 65,5% – nosiciele). Dotyczyło to także mniej licznych materiałów takich jak: krew (100%) oraz wymazy z oka, dróg rodnych i odbytu (75%). W porównaniu z nimi, szczepy kompleksu klonalnego L „C” oraz klony L „A” częściej były izolowane z zakażeń skóry (odpowiednio: 45,8% i 29,2%). Większość szczepów izolowanych z czyraczności było związanych z kompleksem klonalnym L „C” (72,7%), natomiast wszystkie szczepy pochodzące ze zmian pęcherzowych skóry należały do grupy L „A” (100%) – tabela 18 b. Powyższa analiza dowodzi, że w przeciwieństwie do gronkowców P-like pA+, szczepy ludzkie (L „C”, L „A”) są głównie związane z zakażeniami skóry.

4.1.5. Występowanie szczepów P-like pA+ u hospitalizowanych pacjentów i u osób spoza środowiska szpitalnego

Wyniki świadczące o szerokim rozpowszechnieniu szczepów P-like pA+ wśród pacjentów hospitalizowanych i ludzi zdrowych przedstawiono w tabeli 19.

Tabela 19. Występowanie szczepów *S. aureus* z poszczególnych kompleksów klonalnych u hospitalizowanych pacjentów i u osób ze środowiska pozaszpitalnego (nosiciele).

Table 19. Occurrence of *S. aureus* strains from particular clonal complexes in patients from hospitals and in human from community (carriers)

Szpital / Hospital	N	Kompleks klonalny / Clonal complex n (%)		
		P-like pA+	L „C”	L „A”*
GDA 1	11	5 (45,4)	6 (54,5)	0
GDA 2	8	7 (87,5)	0	1 (12,5)
GDA 3	10	3 (30)	6 (60)	1 (10)
GDA 4	13	5 (38,5)	2 (15,4)	6 (46,1)
GDA 5	4	4 (100)	0	0
GDA 6	2	2 (100)	0	0
LĘB	16	14 (87,5)	2 (12,5)	0
SŁU	14	7 (50)	5 (35,7)	2 (14,3)
KRA	2	0	0	2 (100)
SIE	1	0	0	1 (100)
Razem / Total	81	47 (58)	21 (25,9)	13 (16,1)
PN**	29	19 (65,5)	4 (13,8)	6 (20,7)

*singletony / singletons; **środowisko pozaszpitalne (nosiciele) / community (carriers).

Analiza danych wykazała, że szczepy kompleksu klonalnego P-like pA+ występowały wśród pacjentów z wszystkich badanych szpitali położonych na terenie Gdańska i województwa pomorskiego (Lębork, Słupsk). Częstość ich izolowania wynosiła od 30% (GDA 3) do 87,5% (LEB). Ogółem, gronkowce P-like pA+ stanowiły ponad połowę wszystkich szczepów II grupy fagowej pochodzących od hospitalizowanych pacjentów (58%). Wśród osób spoza środowiska szpitalnego (nosiciele) izolowano je również często (65,5%).

Jak wykazano w tabeli 20, szczepy P-like pA+ pochodziły od pacjentów z różnych oddziałów szpitalnych. Częstość izolowania takich szczepów zazwyczaj przekraczała 50% wszystkich gronkowców II grupy fagowej izolowanych w oddziale. Jedynie w oddziałach dermatologicznych i noworodkowych stosunkowo rzadko pojawiały się szczepy P-like pA+ (odpowiednio: 18,7% i 30%). W odróżnieniu od nich, gronkowce ludzkie L „C” przeważały w oddziałach dermatologicznych i ortopedycznych (odpowiednio: 62,5% i 44,4%), a grupa klonów ludzkich L „A” była izolowana głównie w oddziałach noworodkowych (60%).

Tabela 20. Występowanie szczepów *S. aureus* z poszczególnych kompleksów klonalnych wśród pacjentów z różnych oddziałów szpitalnych

Table 20. Prevalence of *S. aureus* strains from particular clonal complexes in patients from various hospital wards

Oddział szpitalny <i>Hospital ward</i>	N	Kompleks klonalny <i>Clonal complex</i> n (%)		
		P-like pA+	L „C”	L „A”**
dermatologia <i>dermatology</i>	16	3 (18,7)	10 (62,5)	3 (18,7)
noworodki <i>neonatology</i>	10	3 (30)	1 (10)	6 (60)
pediatria <i>pediatrics</i>	7	4 (57,1)	2 (28,6)	1 (14,3)
OIOM <i>intensive care unit</i>	12	10 (83,3)	0	2 (16,7)
ortopedia <i>orthopedic</i>	9	5 (55,5)	4 (44,4)	0
chirurgia <i>surgery</i>	9	8 (88,8)	1 (11,2)	0
interna <i>internal medicine</i>	8	6 (75)	2 (25)	0
ginekologia <i>gynecology</i>	2	2 (100)	0	0
laryngologia <i>laryngology</i>	5	5 (100)	0	0
inne <i>other**</i>	3	1 (33,3)	1 (33,3)	1 (33,3)

*singletons / *singletons*

**kardiologia, urologia / *cardiology, urology*.

4.2. Szczepy *Staphylococcus aureus* izolowane od świń i drobiu

Przeprowadzone w pracy badania wykazały, że wśród gronkowców złocistych II grupy fagowej izolowanych od ludzi dominują szczepy należące do biotypu P-like pA+, które nie wytwarzają fibrynolizyny. Brak fibrynolizyny jest właściwością gronkowców pochodzących od zwierząt [43, 127]. Jak dotąd, szczepy biotypu P-like pA+ izolowano głównie od personelu w zakładach mięsnych i z produktów pochodzenia zwierzęcego [72, 80]. Sytuacja powyższa nasuwa więc pytanie, czy badane w pracy szczepy P-like pA+ są spokrewnione z gronkowcami zwierzęcymi. Aby wyjaśnić to zagadnienie porównano gronkowce P-like pA+ izolowane od ludzi z grupą szczepów *S. aureus* pochodzących od świń i drobiu, które – w świetle dotychczasowych doniesień – są najbardziej podobne do szczepów ludzkich, spośród gronkowców izolowanych od zwierząt [64, 66].

4.2.1. Biotypy szczepów zwierzęcych

Zgodnie z kryteriami przyjętymi przez Devriese i Isigidi [41, 79], wśród szczepów pochodzących od zwierząt wyróżniono 5 biotypów – tabela 21.

Tabela 21. Biotypy *S. aureus* wyróżnione wśród szczepów izolowanych od świń i drobiu
Table 21. Biotypes of *S. aureus* distinguished from strains isolated from pigs and poultry

Biotyp / <i>Biotype</i>	Pochodzenie / <i>Origin</i> n (%)	
	świnie / <i>pigs</i>	drób / <i>poultry</i>
ludzki „C” / <i>human „C”</i>	0	0
ludzki „A” / <i>human „A”</i>	2 (13,4)	0
bydłęcy / <i>bovine</i>	0	0
owczy / <i>ovine</i>	0	0
drobiowy / <i>poultry</i>	0	5 (71,4)
<i>P-like pA +</i>	1 (6,7)	0
NHS 1	0	2 (28,6)
NHS 3	12 (80)	0
razem / <i>total</i>	15 (100)	7 (100)

NHS, *non-host-specific*

Większość gronkowców izolowanych od drobiu należało do biotypu drobiowego (71,4%). Nie wytwarzały one fibrynolizyny, białka A oraz hemolizyny β ; wykazywały typ wzrostu „A” na podłożu z fioletem krystalicznym i charakteryzowały się ujemną reakcją z plazmą bydlęcą (tabela 4). Pozostałe szczepy drobiowe miały biotyp NHS 1, który różnił się od biotypu drobiowego reakcją dodatnią z plazmą bydlęcą (28,6%).

Wśród gronkowców izolowanych od świń wyróżniono 3 biotypy, z najliczniejszym biotypem NHS 3 (80%). Charakteryzował się on brakiem wytwarzania fibrynolizyny, ujemną reakcją z plazmą bydlęcą, wytwarzaniem hemolizyny β oraz typem wzrostu „A” na podłożu z fioletem krystalicznym. Pozostałe dwa biotypy – P-like pA+ i ludzki – występowały u pojedynczych szczepów (odpowiednio: 6,7%, 13,4%).

Z przeprowadzonej analizy wynika, że niemal wszystkie szczepy zwierzęce, wybrane do badań należały do 2 biotypów: NHS 3 i drobiowego, które w świetle danych literaturowych są charakterystyczne dla świń i drobiu [72].

4.2.2. Porównanie gronkowców P-like pA+ izolowanych od ludzi ze szczepami *S. aureus* pochodzącymi od zwierząt

4.2.2.1. Właściwości genotypowe

W tabeli 22 porównano wyniki badań genetycznych przeprowadzonych na szczepach pochodzących od zwierząt z grupą gronkowców P-like pA+ izolowanych od ludzi.

Analiza danych wykazała, że badane szczepy zwierzęce znacznie różnią się od gronkowców P-like pA+ izolowanych od ludzi. Typowanie całego genomu bakteryjnego (PFGE) oraz genu *spa* w szczepach od świń wykazało dominację jednego klonu PFGE (80%, PFGE-H) i jednego typu *spa* (t1491) (rycina 13). Należy zaznaczyć, że powyższych typów nie wykryto wśród szczepów P-like pA+ izolowanych od ludzi. Podobne wyniki uzyskano dla gronkowców pochodzących od drobiu. Większość z nich należała do jednego klonu PFGE-O (71,4%) i jednego kompleksu klonalnego *spa*-CCa (71,4%), z dwoma typami *spa* (t3478 i t002). Żaden z wymienionych typów nie występował wśród gronkowców P-like pA+ izolowanych od ludzi.

Wyjątkiem był jeden szczep pochodzący od świń. Należał on do klonu PFGE-A (podtyp PFGE-A3) i typu *spa* t084, podobnie jak niektóre szczepy P-like pA+ od ludzi.

Na podstawie przeprowadzonej analizy można stwierdzić, że gronkowce P-like pA+ nie wykazywały pokrewieństwa klonalnego z gronkowcami zwierzęcymi, gdyż z wyjątkiem jednego szczepu, miały odmienne od nich wzory PFGE i typy *spa*.

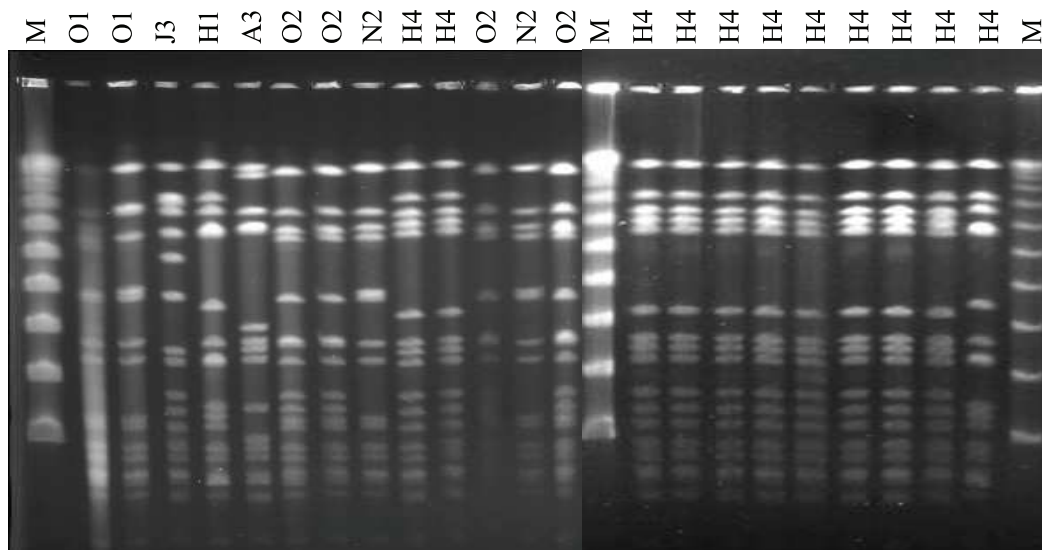
Analiza występowania genów wirulencji potwierdziła dalsze różnice między wymienionymi grupami szczepów. Wśród gronkowców izolowanych od świń przeważał gen enterotoksyny A (*sea*, 73,3%), oraz geny adhezyn wiążących: elastynę (*ebp*, 80%), kolagen (*cna*, 93,3%) i fibrynogen (*fib*, 86,7%). Z wyjątkiem genu *fib*, były to istotne różnice w porównaniu z grupą P-like pA+ od ludzi ($p < 0,0001$). Najwięcej szczepów pochodzących od świń posiadało cztery geny wirulencji: *sea/fib, ebp, cna* (73,3%), szczepy z dwoma genami wirulencji występowały sporadycznie (6,7%), czym istotnie różniły się od gronkowców P-like pA+ od ludzi ($p < 0,0001$).

Tabela 22. Porównanie szczepów *S. aureus* pochodzących od świń i drobiu ze szczepami P-like pA+ od ludzi na podstawie analizy PFGE, genu *spa* oraz genów wirulencji

Table 22. Comparison of *S. aureus* strains from poultry and pigs with P-like pA+ strains from human, based on the results of PFGE analysis, *spa* - typing and the genes of virulence

Pochodzenie <i>Origin</i>	Biotyp <i>Biotype</i>	Podtyp PFGE <i>PFGE subtype</i> (n)	Typ <i>spa</i> <i>spa type</i> (n)	spa-CC	Geny toksyn <i>Toxin genes</i> N				Geny adhezyn <i>Adhesin genes</i> n				
					<i>sea</i>	<i>sec</i>	<i>sed</i>	<i>ebp</i>	<i>cna</i>	<i>bbp</i>	<i>fib</i>	<i>fnbB</i>	
świnia <i>pig</i> (N=15)	NHS 3	H4 (10), N2 (2)	t1491 (12)	#8	10	0	0	0	10	12	0	10	0
	ludzki,,A” /human,,A”	H1 (2)	t008 (2)	#1	1	1	1	2	2	2	0	2	0
	P-like pA+	A3 (1)	t084 (1)	CC 346/084	0	0	0	0	0	0	0	1	1
razem / total (%)					73,3	6,7	6,7	80	93,3	0	86,7	6,7	
drób <i>poultry</i> (N=7)	drobiowy/poultry	O1 (3), O2 (2)	t3478 (3), t002 (2)	CCa	0	0	0	0	0	0	3	5	0
	NHS 1	J3 (2)	t127 (2)	#7	0	2	0	0	2	2	2	2	0
	razem / total (%)				0	28,6	0	0	71,4	28,6	100	0	0
człowiek <i>human</i> (N=66)	P-like pA+	A1 – A23 (23)	t084 (12), t346 (5), t144 (1), t774 (3), t254 (2)	CC 346/084	0	0	0	0	0	0	23	23	
		A1 – A9 (43)	Nt (43)	Nt	0	0	0	0	0	0	43	35	
	razem / total (%)					0	0	0	0	0	0	100	87,9

n – liczba badanych szczepów / number of tested strains; # – singleton / singleton; Nt – nie testowano / not tested. Pogrubione liczby oznaczają istotne statystycznie różnice we właściwościach między szczepami P-like pA+ a pozostałymi grupami szczepów / Bold letters indicate the significance of differences in properties between P-like pA+ strains and other groups of strains.



M – marker wielkości DNA (Lambda Ladder PFG Marker, New England Biolabs, USA)

M – molecular size marker (Lambda Ladder PFG Marker, New England Biolabs, USA).

Ryc. 13. Wzory PFGE otrzymane po cięciu enzymem restrykcyjnym *Sma I* DNA 22 izolatów *S. aureus* pochodzących od świń i drobiu

Fig. 13. PFGE image with the *Sma I* restriction pattern of DNA from 22 *S. aureus* isolates from pigs and poultry

Inne wyniki badania genów wirulencji uzyskano dla szczepów drobiowych. Większość z nich nie posiadała genów toksyn, co je zbliżało do gronkowców P-like pA⁺ od ludzi, lecz profil genów adhezyn różnił te dwie grupy szczepów. Wśród gronkowców izolowanych od drobiu geny *cna* i *bbp* występowały z częstością odpowiednio: 71,4% i 28,6%, podczas gdy wśród gronkowców P-like pA⁺ od ludzi nie wykryto wspomnianych genów. W tej ostatniej grupie szczepów występował często gen białka wiążącego fibronektynę *fnbB* (87,9% – 58/66), nie wykryto go w grupie szczepów drobiowych ($p < 0,0001$). Wśród drobiu, w odróżnieniu od kompleksu P-like pA⁺ dominowały szczepy z trzema genami wirulencji (85,7% – 6/7) – tylko jeden izolat posiadał dwa z nich (14,3%) ($p < 0,0001$).

Przedstawione powyżej wyniki mogą wskazywać na różnice w mechanizmie patogenego działania badanych szczepów zwierzęcych w porównaniu z gronkowcami biotypu P-like pA⁺ izolowanymi od ludzi. Szczepy od świń, dzięki obecności genów enterotoksyn mogą powodować charakterystyczne objawy gronkowcowego zatrucia pokarmowego [10, 23, 80], a obecność genów adhezyn: *ebp* i *cna* wskazuje na związek z innymi postaciami zakażeń [7, 88, 138]. Większość szczepów od drobiu nie posiadała genów toksyn, lecz wykryto wśród nich geny białek wiążących sialoproteinę kostną (*bbp*) i kolagen (*cna*) – adhezyn związanych głównie z zakażeniami kości i stawów [78,

166, 213]. Jak wcześniej zaznaczono, nie wykazano związku szczepów P-like pA+ z określonymi objawami chorobowymi.

4.2.2.2. Właściwości fenotypowe

W tej części pracy porównano niektóre właściwości fenotypowe szczepów zwierzęcych z gronkowcami P-like pA+ pochodzącymi od ludzi. Wyniki przedstawiono w tabeli 23. Z przeprowadzonej analizy wynika, że gronkowce izolowane od świń i drobiu różniły się od szczepów P-like pA+ pochodzących od ludzi niektórymi właściwościami biochemicznymi i lekoopornością.

Rozkład laktozy i wytwarzanie lipazy stwierdzono niemal u wszystkich szczepów izolowanych od świń (odpowiednio 93,3% i 100%), za to oporność na nowobiocynę występowała u nich z niską częstością (13,3%). Szczepy P-like pA+ pochodzące od ludzi zachowywały się odmiennie pod tym względem – nie rozkładały laktozy (1,5%, $p<0,0001$), często były odporne na nowobiocynę (69,7%, $p<0,0001$) i rzadziej wykazywały właściwości lipolityczne (33,3%, $p<0,0001$).

Wyraźne różnice we właściwościach biochemicznych odnotowano również między grupą szczepów drobiowych a gronkowcami P-like pA+ od ludzi. Występowanie takich cech jak: wytwarzanie dihydrolazy argininy, arylamidazy pyrrolidonylu oraz rozkład laktozy dotyczyło większości szczepów pochodzących od drobiu (odpowiednio: 85,7%, 71,4%, 100%). Gronkowce P-like pA+ były mniej aktywne w odniesieniu do wymienionych cech (odpowiednio: 19,7%, $p=0,0009$; 12,1%, $p=0,0008$; 1,5%, $p<0,0001$).

Szczepy izolowane od zwierząt różniły się od biotypu P-like pA+ zachowaniem wobec antybiotyków. Podczas gdy wśród szczepów pochodzących od świń przeważały gronkowce odporne wyłącznie na jeden antybiotyk – penicylinę (93,3%), a mało było szczepów niewrażliwych na tetracyklinę (6,7%), to w obrębie szczepów P-like pA+ te ostatnie stanowiły aż 50% ($p=0,0027$). Wśród szczepów od drobiu przeważały gronkowce wrażliwe na użyte w pracy antybiotyki (57,1%), podczas gdy w grupie P-like pA+ izolowanej od ludzi mniej było szczepów wrażliwych (7,6%, $p=0,0033$).

Tabela 23. Porównanie szczepów *S. aureus* pochodzących od świń i drobiu ze szczepami P-like pA+ od ludzi na podstawie analizy biochemicznej i lekooporności

Table 23. Comparison of *S. aureus* strains from poultry and pigs with P-like pA+ strains from human, based on the results of biochemical analysis and antimicrobial resistance

Pochodzenie <i>Origin</i>	Biotyp <i>Biotype</i>	Dodatkne reakcje biochemiczne <i>Positive biochemical reactions</i>						Antybiotyki / Antibiotics <i>Szczepy odporne / Resistant strains</i>					
		ADH	LAC	PyrA	NOVO	lipaza <i>lipase</i>	Pe	S	T	E	C	inne <i>other</i> ¹⁾	W ²⁾
świnia <i>pig</i> (N=15)	NHS 3	0	12	0	0	12	12	0	0	0	0	0	0
	ludzki „A” <i>human „A”</i>	0	2	1	1	2	2	0	0	0	0	0	0
	P-like pA+	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0
razem / total (%)		0	93,3	13,3	13,3	100	93,3	0	6,7	0	0	0	0
drób <i>poultry</i> (N=7)	drobiowy <i>poultry</i>	4	5	5	3	4	0	0	1	0	0	0	4
	NHS 1	2	2	0	0	0	2*	2	0	0	0	0	0
razem / total (%)		85,7	100	71,4	42,8	57,1	28,6	28,6	14,3	0	0	0	57,1
człowiek <i>human</i> (N=66)	P-like pA+	13	1	8	46	22	54	0	33	4	1	0	5
	(%)	19,7	1,5	12,1	69,7	33,3	81,8	0	50	6,1	1,5	0	7,6

¹⁾ pozostałe antybiotyki / other antibiotics: CC, SXT, CIP, VA, FA, Tec, Ge, Rif, Mup, FOX, S; ²⁾ szczepy wrażliwe na wszystkie badane w pracy antybiotyki / the strains sensitive to all of antibiotics used in this study; * szczepy MRSA (gen *mecA*) / MRSA strains (*mecA* gene). Pogrubione liczby oznaczają istotne statystycznie różnice we właściwościach między szczepami P-like pA+ a pozostałymi grupami szczepów / Bold letters indicate the significance of differences in properties between P-like pA+ strains and other groups of strains.

Dalsze różnice między porównywanymi grupami wykazały badania wrażliwości na bakteriofagi zestawu podstawowego przeznaczonego dla szczepów ludzkich – tabela 24.

Większość gronkowców pochodzących od zwierząt nie typowała się fagami w stężeniu 1×RTD. Dotyczyło to 80% (12/15) szczepów pochodzących od świń oraz wszystkich gronkowców od drobiu (7/7). W przeciwieństwie do nich, wszystkie gronkowce P-like pA⁺ izolowane od ludzi były wrażliwe na fagi podstawowego zestawu już w 1×RTD. Wyjątkiem były szczepy biotypów: ludzkiego „A” i P-like pA⁺ pochodzące od świń. Typowały się one odpowiednio fagami: w stężeniu równym 1×RTD.

Przedstawione wyniki są podstawą do wyciągnięcia wniosku o niższej wrażliwości badanych szczepów zwierzęcych na fagi podstawowego zestawu przeznaczonego dla szczepów ludzkich w porównaniu z gronkowcami biotypu P-like pA⁺ izolowanymi od ludzi.

Tabela 24. Porównanie wrażliwości na bakteriofagi szczepów *S. aureus* pochodzących od świń i drobiu ze szczepami biotypu P-like pA⁺ od ludzi

Table 24. Comparison of susceptibility to the phages of S.aureus strains from pigs and poultry with the strains of biotype P-like pA⁺ from human

Pochodzenie <i>Origin</i>	Biotyp <i>Biotype</i>	Wzór fagowy <i>Phage patterns</i> 1xRTD	n (%)
świnia / <i>pig</i> (N=15)	NHS 3	NT	12 (80)
	ludzki „A” / <i>human „A”</i>	6/42/53/54 75	1 (6,7) 1 (6,7)
	P-like pA ⁺	3A/3C	1 (6,7)
drób / <i>poultry</i> (N=7)	drobiowy / <i>poultry</i>	NT	5 (71,4)
	NHS 1	NT	2 (28,6)
człowiek / <i>human</i> (N=66)	P-like pA ⁺	3C	25 (37,9)
		3C/55	17 (25,7)
		55	15 (22,7)
		3A/3C	3 (4,5)
		3C/55	3 (4,5)
		71	1 (1,5)
		inne / <i>other</i>	2 (3)

NT – nie typujący się / *not typeable*.

4.3. Końcowe porównanie szczepów P-like pA+ z pozostałymi gronkowcami pochodzącymi od ludzi i szczepami izolowanymi od świń i drobiu

Celem analizy w tej części pracy było zestawienie istotnych różnic jakie odnotowano między szczepami P-like pA+ a pozostałymi gronkowcami w badanych cechach fenotypowych i genotypowych – tabela 25.

Z danych zawartych w tabeli 25 wynika, że szczepy P-like pA+ pochodzące od ludzi zachowują się jak odrębna grupa gronkowców, różniąca się właściwościami fenotypowymi i genotypowymi zarówno od pozostałych szczepów izolowanych od ludzi (L „C”, L „A”), jak też szczepów izolowanych od drobiu i pochodzących od świń.

Tabela 25. Najważniejsze różnice w cechach fenotypowych i genotypowych między gronkowcami P-like pA+ a pozostałymi szczepami od ludzi, świń i drobiu

Table 25. The most important differences of phenotypic and genotypic properties between P-like pA+ staphylococci and other strains from human, pigs and poultry

Właściwości <i>Properties</i>	Kompleks klonalny <i>Clonal complex</i> (%)			Szczepy od świń <i>Strains from pigs</i> N=15	Szczepy od drobiu <i>Strains from poultry</i> N=7
	P-like A+ N=66	L „C” N=25	L „A”** N=19		
testy biochemiczne / <i>biochemical tests</i> :					
ADH	19,7	100	84,2	0	85,7
LAC	1,5	96	100	93,3	100
PyrA	12,1	16	26,3	20	71,4
NOVO	69,7	68	84,2	13,3	42,8
lipaza <i>lipase</i>	33,3	56	47,4	100	57,1
wrażliwość na fagi / <i>susceptibility to the phages</i> :					
1×RTD **	100	100	100	20	0
lekooporność / <i>antimicrobial resistance</i> :					
T	50	20	5,2	6,7	14,3
E	6,1	20	42,1	0	0
geny toksyn / <i>toxin genes</i> :					
<i>eta</i> ,	0	36	52,6	0	0
<i>etb</i>	0	24	0	0	0
<i>lukS-PV/lukF-PV</i>	0	52	0	0	0
<i>sea-sed, tst</i>	0	12	21	80	28,6

Właściwości <i>Properties</i>	Kompleks klonalny <i>Clonal complex</i> (%)			Szczepy od świń <i>Strains from pigs</i> N=15	Szczepy od drobiu <i>Strains from poultry</i> N=7
	P-like A+ N=66	L „C” N=25	L „A”* N=19		
geny adhezyn / <i>adhesin genes</i> :					
<i>ebp</i>	0	96	73,6	80	0
<i>cna</i>	0	92	10,5	93,3	71,4
<i>bbp</i>	0	88	5,2	0	28,6
<i>fnbB</i>	87,9	0	0	6,7	0
potencjał chorobotwórczy / <i>virulence potential</i> :					
2-geny / <i>2-genes</i>	87,9	0	10,5	6,7	14,3

*singletony / *singletons*; ** typowanie w 1×RTD / *typing at 1×RTD*. Pogrubione liczby oznaczają istotne statystycznie różnice we właściwościach między szczepami P-like pA+ a pozostałymi grupami szczepów / *Bold letters indicate the significance of differences in properties between P-like pA+ strains and other groups of strains.*

Wśród szczepów P-like pA+ wykazano – niespotykany w innych grupach szczepów – brak rozkładu laktozy, brak genów toksyn, a spośród adhezyn wykryto obecność genu wiążącej fibronektynę (*fnbB*). Potencjał badanej grupy szczepów był najniższy w porównaniu ze szczepami ludzkimi (L „C”, L „A”) oraz zwierzęcymi izolowanymi od świń i drobiu.

5. DYSKUSJA

Podstawową cechą gronkowców złocistych pochodzących od ludzi jest zdolność wytwarzania fibrynolizyny, natomiast jej brak charakteryzuje zwierzęce szczepy *Staphylococcus aureus* [43,127]. Przeprowadzone w obecnej pracy badania wykazały, że niewytwarzanie fibrynolizyny występuje również bardzo często wśród szczepów II grupy fagowej izolowanych zarówno od chorych jak i od zdrowych ludzi.

Okazało się, zgodnie z klasyfikacją Devriese i Isigidi, że niemal wszystkie fibrynolizynoujemne gronkowce wykryte w pracy, odpowiadają biotypowi P-like pA+ (*Poultry like protein A positive*). Biotyp ten, poza brakiem fibrynolizyny, charakteryzuje się również niewytwarzaniem hemolizyny β , ujemną reakcją z plazmą bydlęcą, zdolnością wytwarzania białka A oraz typem wzrostu „A” na podłożu z fioletem krystalicznym [41,79]. Zjawisko występowania fibrynolizynoujemnych gronkowców biotypu P-like pA+ w środowisku szpitalnym było zaskakujące, gdyż dotychczas izolowano je głównie z produktów mięsnych lub od osób zatrudnionych w przemyśle mięsnym [72, 79, 80].

Już pierwsze prace dotyczące epidemiologii zakażeń gronkowcowych z wykorzystaniem typowania bakteriofagowego wykazały, że dla *S. aureus* charakterystyczne jest pojawianie się nowych, dawniej niespotykanych fagotypów, które – zgodnie z badaniami Bannerman – można z dużym prawdopodobieństwem traktować jako klon [11]. Najnowsze badania w tym zakresie wykazały klonalną strukturę populacyjną gronkowców złocistych [49, 54, 131]. Zastosowanie metod genetycznych udowodnia pojawianie się epidemicznych klonów *S. aureus* o określonych fenotypach i genotypach, które obejmują swym zasięgiem regiony, kraje czy nawet całe kontynenty [20, 30, 49, 62, 73, 76, 106, 114, 118, 119, 131, 141, 144, 191].

W nawiązaniu do obecnej pracy nasuwa się więc pytanie, czy brak wytwarzania fibrynolizyny przez gronkowce biotypu P-like pA+ jest cechą spotykaną w różnych szczepach II grupy bakteriofagowej jako wynik niezależnych zdarzeń, czy też mamy do czynienia z nieznanym dotychczas klonem, w którym cecha niewytwarzania fibrynolizyny dotyczy jednego szczepu. Badania prowadzone w pracy wskazują na drugą możliwość. Dzięki zastosowaniu elektroforezy pulsacyjnej poddającej analizie cały genom *S. aureus*, jak też sekwencjonowaniu zamplifikowanego regionu X genu *spa* zaobserwowano, że wszystkie szczepy biotypu P-like pA+ są spokrewnione – tworzą bowiem jeden klon PFGE-A i dominuje wśród nich jeden kompleks klonalny spa-CC346/084. Świadczy to o tym, że fenotypowy brak fibrynolizyny w szczepach P-like pA+ jest preferowany przez jeden organizm, który następnie rozprzestrzenia się wewnątrz klonu. W odróżnieniu od gronkowców P-like pA+, pozostałe szczepy II grupy fagowej reprezentowały biotyp ludzki i były zróżnicowane klonalnie, co wykazały wyniki obydwu zastosowanych metod (rycina 3, tabela 7). Należy podkreślić, że żaden spośród szczepów ludzkich nie należał do klonu reprezentowanego przez szczepy P-like pA+, co potwierdza, że gronkowce P-like pA+ są jednostką genetycznie odrębną od pozostałych szczepów II grupy fagowej należących do biotypu ludzkiego. Nie ulega wątpliwości, że obecna praca jako pierwsza porusza zagadnienie struktury klonalnej populacji szczepów biotypu P-like pA+ pochodzących od pacjentów hospitalizowanych i tych spoza tego środowiska. Nieliczne doniesienia na ten temat w dostępnej literaturze dotyczą jedynie środowiska zwierzęcego i wskazują na podobną prawidłowość [72, 176]. Hennekinne i wsp.[72], wykryli szczepy biotypu P-like pA+ w produktach mięsnych oraz wśród pracowników przetwórstwa mięsnego reprezentujące jeden klon PFGE, podobnie jak

Rodgers i wsp. [176] badając szczepy P-like pA⁺ pochodzące od nosicieli wśród pracowników wylęgarni drobiu.

Jak wcześniej wspomniano, gronkowce biotypu P-like pA⁺ nie były dotychczas opisywane w szpitalach. Powstaje więc pytanie o przyczynę tak licznego ich występowania i o to, czy przewyższają one inne gronkowce II grupy bakteriofagowej pod względem chorobotwórczości i lekooporności.

O zjadliwości klinicznej bakterii stanowią przede wszystkim dwie właściwości: chorobotwórczość i lekooporność. Miarą chorobotwórczości jest zdolność wytwarzania toksyn i adhezyn [57, 166]. Jak wykazano w pracy szczepy P-like pA⁺ – w przeciwieństwie do gronkowców ludzkich – nie wytwarzały fibrynolizyny, która uznawana jest za jeden z ważniejszych gronkowcowych czynników wirulencji. Dzięki połączeniu z plazminogenem fibrynolizyna przekształca go w enzym rozkładający między innymi białka bariery tkankowej. Ich degradacja sprzyja rozwojowi zakażeń inwazyjnych [19, 113].

Próbując odpowiedzieć na powyższe pytania, w obecnej pracy zbadano częstość występowania genów kodujących toksyny i adhezyny w szczepach P-like pA⁺ i porównano z wynikami uzyskanymi dla szczepów ludzkich (L „C”, L „A”). Jak wynika z przeprowadzonych badań, gronkowce P-like pA⁺ nie zawierają genów toksyn, które biorą udział w patomechanizmie zakażeń skóry i rzadziej niż szczepy ludzkie (L „C”, L „A”) występują w zakażeniach skóry (rycina 7, tabela 18 a), co można tłumaczyć prawdopodobnie obecnością systemu restrykcyjno – modyfikacyjnego (RM), który silnie kontroluje wszystkie typy pozyskiwania DNA i odgrywa rolę w formowaniu klonalnej struktury populacyjnej *S. aureus* [173, 216]. Dla szczepów ludzkich charakterystyczne były geny eksfoliatyn czy leukocydyny Panton-Valentine (rycina 7).

Występowanie wysokiego odsetka genów eksfoliatyn wśród szczepów ludzkich badanych w obecnej pracy ma niewątpliwie związek z typowaniem się przez nie fagiem 71 i pochodzeniem głównie ze zmian skórnych. Jak dowodzą wcześniejsze badania istnieje zależność między wytwarzaniem eksfoliatyn a wrażliwością na faga 71 [2, 6, 90, 96, 163, 164]. Już Parker, Tomlinson i Williams w połowie ubiegłego wieku zwrócili uwagę, że wśród gronkowców złośliwych II grupy bakteriofagowej, zdolność do wywoływania powierzchniowych zmian skórnych wiąże się najczęściej z wrażliwością na faga 71. Ponad 75% gronkowców izolowanych przez nich z liszajca zakaźnego należała do typu fagowego „71” [163, 164]. Późniejsze badania innych autorów udowodniły, że typ ten, dzięki wytwarzaniu eksfoliatyny zwanej toksyną epidermolityczną, wyróżnia się szczególną zdolnością wywoływania zakażeń skóry, głównie pod postacią liszajca zakaźnego, pęcherzycy lub – w cięższych wypadkach – choroby Rittera [2, 6, 90]. Według Kondo i wsp., niemal wszystkie szczepy izolowane z pęcherzycy noworodków i z liszajca pęcherzowego produkowały eksfoliatyny A lub A/B [96]. Wyniki obecnej pracy wskazują na podobną zależność, gdyż większość gronkowców ludzkich (L „A”, L „C”) izolowano głównie ze zmian skórnych i posiadały one geny eksfoliatyn (tabela 9, tabela 18 a).

Powszechne występowanie genów leukocydyny Panton-Valentine (*lukS-PV/lukS-PV*) wśród szczepów ludzkich L „C” należy tłumaczyć – podobnie jak genów eksfoliatyn – ich pochodzeniem. W obecnej pracy większość szczepów ludzkich L „C” izolowano od pacjentów z czyracznością (72,7%) i charakteryzowała je głównie obecność genów kodujących leukocydynę Panton-Valentine (52%). Już w 1992 roku Cribier i wsp. wykazali zależność między wytwarzaniem leukocydyny Panton-Valentine a czyracznością [37]. W 1999 roku Lina i wsp. wykorzystując reakcję PCR do zbadania

172 izolatów *S. aureus* dla genów PVL stwierdzili podobnie silny związek wspomnianej toksyny z czyracczością i dodatkowo z nekrotyczną pneumonią u dzieci i młodych osób [121].

Adherencja *S. aureus* do komórek gospodarza jest istotnym etapem kolonizacji i czynnikiem ryzyka rozwoju zakażenia inwazyjnego [57]. Związana jest ona z grupą białek (MSCRAMM), które łączą się z zewnątrzkomórkowymi elementami tkanek gospodarza [57, 166, 172]. W obecnej pracy stwierdzono, że pod tym względem szczepu P-like pA+ różnią się od gronkowców ludzkich (L „C”, L „A”). Niemal wszystkie szczepy P-like pA+ posiadały gen białka wiążącego fibronektynę (*fnbB*, 87,9%), natomiast nie wykryto wśród nich genów białek wiążących kolagen, sialoproteinę kostną i elastynę (*cna*, *bbp* i *ebp*). W przeciwieństwie do nich, wśród gronkowców ludzkich L „C” rzadko występował gen *fnbB*, za to dominowały geny *bbp*, *cna* i *ebp* (tabela 10). Znana jest rola białek FnBps w przyłączaniu gronkowców złocistych do powierzchni pokrytych fibronektyną i za inicjowanie procesu zakażenia [57, 78, 110, 166]. Powszechne występowanie fibronektyny w osoczu, płynach ustrojowych i macierzy zewnątrzkomórkowej stwarza duże możliwości adherencji szczepów *S. aureus* wytwarzających białka FNBP [57, 78]. Jednocześnie dotychczasowe badania eksperymentalne sugerują, że szczepy *S. aureus*, które wytwarzają białka wiążące fibronektynę, odpowiadają za infekcyjne zapalenie wsierdza [27, 57, 166]. Kuypers i Proctor wykazali bowiem na modelu szczurzym, że mutant defektywny w białka FNBP znacznie redukuje adherencję do uszkodzonych zastawek mięśnia sercowego [110]. Schennings zapoczątkował ochronę przeciw gronkowcowemu zapaleniu wsierdza poprzez immunizację zwierząt białkami FNBP [188] Tristan i wsp. udowodnili, że gen *fnbB* kodujący wiążące fibronektynę białko B, jest związany częściej z zapaleniem wsierdza niż zapaleniem stawów czy zakażeniem kości [211]. Na rolę białek FNBP w adherencji do ludzkiego nabłonka oddechowego zwrócił uwagę Mongodin, który wykazał, że 97% szczepów izolowanych z wydzielin dróg oddechowych pacjentów z mukowiscydozą i szpitalnym zapaleniem płuc posiadało wymienione wcześniej białka [137]. Wyniki te znajdują potwierdzenie w obecnej pracy, gdyż gen *fnbB* był szeroko rozpowszechniony wśród szczepów P-like pA+ (rycina 12) i szczepy te izolowano głównie z dróg oddechowych (86,5%), krwi (100%) oraz od nosicieli (65,5%) – tabela 18.

Białka pośredniczące w przyłączaniu gronkowców do sialoproteiny i kolagenu – głównych elementów budulcowych kości – odgrywają dużą rolę w gronkowcowych zapaleniach kości i stawów i niemal zawsze są obecne wśród szczepów izolowanych z takich zakażeń [75, 78, 88, 166, 211, 213, 214]. W obecnej pracy wykazano, że niemal wszystkie szczepy ludzkie (L „C”), w przeciwieństwie do gronkowców P-like pA+, charakteryzowały się częstym występowaniem genów białek wiążących sialoproteinę kostną (*bbp* – 88%) i kolagen (*cna* – 92%). Fakt ten może wskazywać na związek badanych gronkowców ludzkich (L „C”) z zakażeniami kości i stawów, tym bardziej, że szczepy L „C” licznie występowały w oddziałach ortopedycznych (44%) – tabela 20.

W większości przypadków, ciężkich chorób gronkowcowych nie można tłumaczyć działaniem jednego czynnika, lecz należy brać pod uwagę jednoczesny udział kilku czynników w procesie zakażenia. W niniejszej pracy porównano możliwości chorobotwórcze szczepów kompleksu P-like pA+ oraz szczepów ludzkich (L „C” i L „A”) poprzez określenie potencjału chorobotwórczego, który według van Leeuwen mierzony jest liczbą genów kodujących czynniki zjadliwości na szczep [117]. Uwzględniając tą zasadę i wykrywanie trzynastu genów wirulencji stwierdzono, że wyższy potencjał chorobotwórczy miały szczepy ludzkie niż gronkowce P-like pA+ (rycina 14). Składało

się na niego od pięciu (60%) do sześciu (32%) genów wirulencji w kompleksie klonalnym szczepów ludzkich L „C” oraz trzy (68,4%) geny obecne wśród gronkowców ludzkich L „A”. W odróżnieniu od nich, potencjał chorobotwórczy szczepów P-like pA⁺ obejmował w większości dwa geny wirulencji (87,9%). Na podstawie przytoczonych danych można więc stwierdzić, że szczepy P-like pA⁺ są mniej patogenne niż pozostałe szczepy II grupy fagowej (L „C”, L „A”). Według dostępnej wiedzy, jest to pierwsze doniesienie o możliwościach chorobotwórczych szczepów biotypu P-like pA⁺ izolowanych od pacjentów hospitalizowanych i tych spoza środowiska szpitalnego.

Analiza dotychczasowej historii naturalnej gronkowców złocistych, które w różnych okresach dominowały w szpitalach wskazuje, że ulegają one stałej ewolucji. Jej główną siłą sprawczą jest narastająca presja selekcyjna stosowanych w leczeniu antybiotyków [22, 24, 30]. Łatwo udokumentować, że w kolejnych okresach dominowały szczepy, które dzięki nowym mechanizmom lekooporności lepiej dostosowały się do nowoczesnych sposobów leczenia i oparły się działaniu antybiotyków [24, 30, 159, 184]. Wśród nich główne miejsce zajmują odporne na metycylinę gronkowce złociste (MRSA), które ze szczepów niewrażliwych wyłącznie na antybiotyki β -laktamowe w latach 60. stały się w ostatnim okresie odporne na wiele grup antybiotyków [30, 184]. W wypadku szczepów P-like pA⁺ mechanizm ten nie wydaje się odgrywać istotnej roli, gdyż – jak wykazano w pracy – nie różnią się one wyraźnie od typowych szczepów II grupy bakteriofagowej, które jak wiadomo wykazują niższą oporność na leki niż gronkowce z pozostałych grup fagowych [50, 53]. Kompleks klonalny gronkowców P-like pA⁺ wykazywał głównie oporność na penicylinę (81,8%) czy tetracyklinę (50%). W żadnym szczepie nie wykryto oporności na metycylinę i nie odnotowano szczepów wielolekoopornych (tabela 14, rycina 15). Dodatkowe badania MIC tetracykliny oraz wyniki testu 2 krążków (tabela 14, tabela 16) wykazały natomiast niską wartość MIC tetracykliny i dużą średnicę strefy zahamowania wzrostu wokół krążka z minocykliną, co może świadczyć o oporności na tetracyklinę typu „efflux”, kodowanej przez gen *tetK* umieszczony na plazmidzie. Jak wykazały badania innych autorów, wspomniany typ oporności występuje często wśród gronkowców wrażliwych na metycylinę [192, 212].

Czy opisany klon P-like pA⁺ może stanowić zagrożenie w środowisku szpitalnym? Jak już wcześniej wspomniano, chorobotwórczość i lekooporność są wyznacznikiem zjadliwości klinicznej bakterii. Badania przeprowadzone w obecnej pracy wskazują, że gronkowce P-like pA⁺ nie zawierają genów toksyn, które biorą udział w patomechanizmie zakażeń skóry i rzadziej niż biotypy typowo ludzkie występują w zakażeniach skóry. Niemniej jednak występują w różnych materiałach klinicznych pochodzących od chorych. Oznacza to, że mogą wywoływać różne zakażenia, lecz są mało inwazyjne i trudno im pokonać barierę nieuszkodzonej skóry, czym wydają się różnić od innych szczepów II grupy bakteriofagowej. Pod względem lekooporności nie różnią się wyraźnie od typowych ludzkich szczepów II grupy bakteriofagowej, które wykazują niższą oporność na leki niż gronkowce z pozostałych grup fagowych [50, 53].

Mimo wrażliwości na antybiotyki i niskiego potencjału chorobotwórczego, badane w pracy szczepy P-like pA⁺ są rozpowszechnione wśród hospitalizowanych pacjentów. Stanowiły one 58% szczepów II grupy fagowej izolowanych od pacjentów różnych szpitali i występowały w różnych materiałach klinicznych (tabela 18). O ich rozprzestrzenianiu w środowisku szpitalnym wydają się więc decydować inne czynniki. Mogą to być duże właściwości kolonizacyjne szczepów P-like pA⁺. Wskazuje na to profil genów wirulencji z dominującym w tej grupie szczepów genem białka wiążącego fibronektynę (*fnbB*). Dodatkowe znaczenie może mieć tutaj długość polimorficznego frag-

mentu X genu *spa*. Badania Frenay i wsp. wykazały, że długość polimorficznego odcinka genu *spa* ma związek z charakterem epidemicznym szczepów [58]. Szczepy gronkowców, które mają w polimorficznym fragmencie większą niż 7-krotną liczbę powtórzeń należy ich zdaniem uznać za epidemiczne. Posiadanie przez szczep dłuższego regionu polimorficznego może wiązać się z lepszą ekspozycją miejsca wiązania białka A z fragmentem F_c przeciwciał, co w konsekwencji ułatwia przyleganie szczepu do komórek gospodarza [58]. Badane w pracy gronkowce P-like pA⁺ zawierały w większości 11- i 12-krotne powtórzenia wspomnianego odcinka (89,4%), co niewątpliwie miało wpływ na ich rozprzestrzenienie się. Objęły one swym zasięgiem pacjentów aż ośmiu na dzieśnięć badanych szpitali (tabela 19).

Jak wspomniano wcześniej, w obrębie II grupy bakteriofagowej występują dwa rodzaje szczepów. Jedne to mało znane gronkowce biotypu P-like pA⁺, drugie to typowe gronkowce biotypu ludzkiego. Dotychczasowa wiedza na temat grupy P-like pA⁺ jest niewielka i wskazuje na występowanie ich u ludzi mających kontakt ze zwierzętami lub produktami pochodzenia zwierzęcego [79]. Przeprowadzone w pracy badania zmieniają ten pogląd. Świadczą one o ekspansji takich szczepów do innych środowisk i występowaniu w wyższym odsetku u pacjentów hospitalizowanych niż gronkowców ludzkich II grupy fagowej.

U ludzi mogą zdarzać się zakażenia zwierzęcymi szczepami gronkowców złocistych, których podstawową cechą identyfikacyjną jest niezdolność do wytwarzania fibrynolizyny [39, 43, 116, 120, 217]. Z badań Hajka wynika, że szczepy pochodzące od różnych zwierząt mają odmienne właściwości fenotypowe [64, 66]. Na ich podstawie można określić biotyp charakterystyczny dla danego gospodarza. Izolowanie szczepów o biotypie zwierzęcym od ludzi jest zjawiskiem rzadko spotykanym i dotyczy głównie osób będących w bliskim kontakcie ze zwierzętami [46, 120, 217]. Spośród szczepów izolowanych od ludzi, szczególne podobieństwo do gronkowców zwierzęcych wykazuje biotyp P-like pA⁺. Szczepy te różnią się od biotypu drobiowego jedynie wytwarzaniem białka A, a pod względem takich cech jak: wytwarzanie fibrynolizyny, hemolizyny β, reakcji z fioletem krystalicznym i koagulacji plazmy bydlęcej, są z nimi identyczne [72, 79]. Dotychczas nie zbadano, czy szczepy biotypu P-like pA⁺ są genetycznie spokrewnione ze szczepami zwierzęcymi.

W świetle tych danych zasadnym jest postawienie pytania o pochodzenie szczepów biotypu P-like pA⁺. W nielicznych pracach dotyczących biotypu P-like pA⁺ nie podejmowano tego tematu. W obecnej pracy podjęto po raz pierwszy taką próbę w odniesieniu do szczepów P-like pA⁺ II grupy fagowej izolowanych od ludzi.

Pokonanie przez drobnoustroj bariery międzygatunkowej pomiędzy zwierzęciem i człowiekiem ma ważne znaczenie epidemiologiczne. W wypadku gronkowców są opisane przykłady wywołania zakażeń szczepami zwierzęcymi np. psimi u ludzi, bywa też odwrotnie [45, 217]. Wydaje się oczywiste, że w takiej sytuacji ważne są nie tylko mechanizmy fizjologiczne makroorganizmu lecz także, a może przede wszystkim, zdolności adaptacji drobnoustrojów kolonizujących nowy dla nich organizm. W odniesieniu do szczepów drobiowych, wystarczy by nabyły one zdolność wytwarzania białka A, by stały się w klasyfikacji Isigidi i Devriese'a fenotypowo nieodróżnialne od szczepów P-like pA⁺ [79]. Wydaje się to możliwe, ponieważ jak wykazały badania przeprowadzone w pracy, gen *spa*, odpowiadający za wytwarzanie białka A, był obecny wśród szczepów drobiowych, a ujemne próby na występowanie tego czynnika można wytłumaczyć między innymi brakiem ekspresji genu białka A [169].

Jak wynika z dostępnej literatury, przypadki izolowania szczepów biotypu P-like pA⁺ dotychczas były sporadyczne i dotyczyły wyłącznie specyficznych środowisk rzeźni i zakładów mięsnych w których istniał kontakt z mięsem lub zwierzętami [79]. Niniejsze badania jako pierwsze wykazały, że omawiany klon gronkowców P-like pA⁺ jest szeroko rozpowszechniony zarówno w środowisku szpitalnym, jak też wśród nosicieli spoza tego środowiska. Pod uwagę należy wziąć dwie genezy pojawienia się biotypu P-like pA⁺. Mogą to być gronkowce ludzkie, które utraciły cechę wytwarzania fibrynolizyny, lub szczepy zwierzęce, które nabyły zdolność wytwarzania białka A.

Jak wynika z badań Hájka i wsp. najbardziej podobne do szczepów ludzkich są gronkowce izolowane głównie od drobiu i świń [64, 67]. Typują się one fagami II grupy, szczególnie fagiem 3A, dają negatywną reakcję z plazmą bydłą, ale pozytywną z plazmą ludzką, wykazują dodatni test na podłożu z fioletem krystalicznym, wytwarzają hemolizynę β i ujawniają wysoką aktywność lipolityczną [60, 64, 67]. Próbuując odpowiedzieć na wcześniej zadane pytanie, w obecnej pracy porównano więc szczepy biotypu P-like pA⁺ izolowane od ludzi z gronkowcami pochodzącymi od tych zwierząt. Szczepy zwierzęce użyte do badań reprezentowały biotypy charakterystyczne dla badanych grup zwierząt (tabela 22). Biotyp drobiowy występował u 71,4% gronkowców izolowanych od drobiu, a 80% szczepów pochodzących od świń miało cechy biotypu NHS 3, który według najnowszych badań jest najbardziej charakterystyczny dla świń [41, 72, 79]. Wyniki testów genetycznych przeprowadzonych w obecnej pracy nie pozostawiły wątpliwości. Zarówno wzory restrykcyjne chromosomalnego DNA, pociętego enzymem *Sma*I otrzymane w elektroforezie w zmiennym polu elektrycznym (PFGE) oraz typy genu *spa* nie pokrywały się w porównywanych grupach szczepów. Izolaty pochodzące z zakażeń drobiu należały głównie do klonu PFGE – O i tworzyły kompleks klonalny *spa*-CCa, z typami *spa*: t3478 i t002. Podobna sytuacja występowała wśród szczepów świńskich (klon PFGE – H, typ *spa* t1491). Wymienionych typów nie znaleziono w grupie szczepów P-like pA⁺ pochodzących od ludzi (tabela 22), co może wskazywać na brak genetycznego pokrewieństwa między badanymi szczepami od świń i drobiu a pochodzącymi od ludzi szczepami P-like pA⁺.

Kluczową cechą, dla odróżnienia szczepów ludzkich od zwierzęcych była jak dotychczas zdolność wytwarzania fibrynolizyny [122, 127]. Niestety wydaje się, że dotychczas nie udało się ustalić ścisłych kryteriów opartych na cechach fenotypowych lub genotypie, które pozwalałyby identyfikować szczepy ludzkie i zwierzęce. Dlatego rozważając wyniki naszych badań, możemy jedynie wskazywać na różnice pomiędzy szczepami, natomiast ich interpretacja jest obciążona dużą dozą subiektywizmu. Nie można więc, nie znalazłszy podobieństwa pomiędzy szczepami P-like pA⁺ a szczepami od drobiu czy świń, opierać się jedynie na różnicach i mówić, że nie są powiązane ze sobą. Równie dobrze, opierając się na cechach fenotypowych i genotypie, można mówić o braku podobieństwa pomiędzy typem „71” i szczepami P-like pA⁺ i na tej podstawie kwestionować powiązanie szczepów P-like pA⁺ z gronkowcami ludzkimi. Tak więc sprawa związku pomiędzy gronkowcami zwierzęcymi, a szczepami P-like pA⁺ pozostaje nadal otwarta, choć w moim przekonaniu istnieje.

Według aktualnych danych, większość szczepów izolowanych od ludzi wykazuje odmienność genetyczną w typach klonalnych ze szczepami zwierzęcymi [117, 119]. Badania prowadzone w Danii wykazały, że spośród wszystkich izolatów *S. aureus* związanych z zakażeniami krwi u ludzi, tylko 1 typ *spa*, najczęstszy wśród izolatów świńskich i bydłych, pojawił się również w grupie szczepów ludzkich [119]. Podobnie van Leeuwen udowodnił, że szczepy *S. aureus* izolowane jedynie od zwierząt z

bliskiego kontaktu z ludźmi były klasyfikowane w jednej z głównych grup klonalnych utworzonych w obrębie ludzkich szczepów *S. aureus* [117]. W obecnej pracy wykazano, że typ *spa* t084 jest najczęstszy w kompleksie klonalnym szczepów P-like pA+ (tabela 7). Jak wynika z dostępnej literatury, wspomniany typ *spa* występuje powszechnie wśród szczepów *S. aureus* pochodzących od ludzi [63]. Wśród metycylinowrażliwych gronkowców złocistych izolowanych z zakażeń inwazyjnych, szczepy o typie *spa* t084 były na drugim miejscu pod względem częstości występowania w Szwajcarii (8%), Włoszech (8,8%), Niemczech (7,1%) i Szwecji (8,2%) [63, 152]. W naszym kraju typ *spa* t084 występował z podobną częstością wśród szczepów izolowanych z zakażeń krwi – od 9,9% do 10,2% [63, 160]. Jednocześnie dostępne prace nie wskazują na jego występowanie wśród szczepów izolowanych od zwierząt [46, 71, 147]. Fakt ten świadczy o zdolnościach rozprzestrzeniania się typu *spa* t084 głównie wśród populacji szczepów ludzkich a nie zwierzęcych. Jeżeli weźmiemy pod uwagę fakt częstego występowania wspomnianego typu w szczepach P-like pA+ może to przemawiać za ludzkim pochodzeniem gronkowców biotypu P-like pA+ badanych w obecnej pracy.

Podobne wnioski można wyciągnąć na podstawie wyników typowania podstawowym zestawem fagów przeznaczonym dla szczepów ludzkich. Wszystkie gronkowce biotypu P-like pA+ były wrażliwe na fagi II grupy już w stężeniu faga równym $1 \times \text{RTD}$, podczas gdy szczepy pochodzące od zwierząt znacznie rzadziej typowały się w takich warunkach (tabela 24). Jak wykazały dotychczasowe badania, szczepy pochodzące od zwierząt rzadko typują się fagami podstawowego zestawu przeznaczonego dla szczepów ludzkich, a lepiej fagami przeznaczonymi dla gronkowców zwierzęcych [194]. Wykazana w pracy wrażliwość wszystkich szczepów P-like pA+ na fagi przeznaczone dla gronkowców ludzkich już w $1 \times \text{RTD}$ może wskazywać więc na ludzkie pochodzenie badanej grupy szczepów.

Wobec powyższych danych bardziej prawdopodobny wydaje się pogląd, że biotyp P-like pA+ pochodzący od hospitalizowanych pacjentów i od osób spoza środowiska szpitalnego zawiera szczepy ludzkie, które utraciły zdolność wytwarzania fibrynolizyny. Jak podają nieliczni autorzy, właściwość ta jest w niektórych gronkowcach niestabilna [39]. Możliwość produkowania fibrynolizyny jest bowiem wynikiem konwersji lizogennej spowodowanej wbudowaniem się DNA bakteriofaga zawierającego gen *sak* do genomu bakteryjnego [151, 221]. Dotychczasowe badania wykazały, że fibrynolizynododatnie gronkowce biotypu ludzkiego mogą tracić zdolność wytwarzania fibrynolizyny w efekcie przystosowania się do nowego organizmu, stając się fibrynolizynoujemnymi szczepami biotypu NHS [39]. Wśród badanych w pracy fibrynolizynoujemnych gronkowców biotypu P-like pA+ nie wykryto genu *sak* odpowiedzialnego za jej wytwarzanie (rycina 2). Wydaje się więc, że mogło u nich dojść do utraty genu *sak*. Bakteriofagi mogą utrzymywać swoje DNA w komórce bakteryjnej w postaci plazmidu. Badania bakteriofaga λ *Escherichia coli* wykazały, że na wskutek delekcji lub mutacji DNA faga następuje utrata funkcji potrzebnej do jego reprodukcji i pozostaje on w komórce zmieniony, pod postacią plazmidu [205]. Wiadomo również, że genom gronkowców złocistych zawiera często materiał genetyczny bakteriofagów niosących różne markery wirulencji i niekiedy może nastąpić zjawisko ich gubienia [26, 148]. Według niektórych autorów przyczyną wspomnianego procesu są mutacje, których efekt w toku ewolucji ulega nagromadzeniu i w konsekwencji prowadzi do masywnej utraty DNA profaga z genomu bakteryjnego [25, 115]. Powyższe dane potwierdzają pogląd przedstawiony w obecnej pracy o powstaniu fibrynolizynoujemnego klonu P-like pA+ poprzez utratę genu *sak* przez szczepy *S. aureus* biotypu ludzkiego.

6. WNIOSKI

Na podstawie przeprowadzonych badań można wyciągnąć następujące wnioski:

1. Wśród gronkowców złocistych II grupy bakteriofagowej izolowanych od ludzi występują fibrynolizynoujemne szczepy należące do biotypu P-like pA⁺ (*Poultry like protein A positive*), podobnego do biotypu drobiowego. Pozostałe gronkowce II grupy fagowej wytwarzają fibrynolizynę i mają cechy typowe dla biotypu ludzkiego.
2. Wśród hospitalizowanych pacjentów regionu gdańskiego przeważają, dotychczas nieopisywane w środowisku szpitalnym, gronkowce biotypu P-like pA⁺
3. Gronkowce biotypu P-like pA⁺ stanowią jeden klon, odmienny pod względem właściwości genotypowych i fenotypowych od klonów biotypu ludzkiego
4. Gronkowce P-like pA⁺ wykazują niższy potencjał chorobotwórczy niż szczepy należące do biotypu ludzkiego
5. Gronkowce P-like pA⁺ prawdopodobnie pochodzą od gronkowców biotypu ludzkiego, które utraciły gen *sak* odpowiedzialny za wytwarzanie fibrynolizyny.

7. PIŚMIENNICTWO

1. Abramson C.: Staphylococcal enzymes. W: Cohen J.O. (red.): The staphylococci. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1972, s. 187-248.
2. Albert S.R., Baldwin S., Czekajewski A., van Soestbergen R., Nachman A., Robertson A.: Bullous impetigo due to group II *Staphylococcus aureus*. Am. J. Dis. Child. 1970, 120, 10-13.
3. Al-Tarazi Y.A., Albetar M.A., Alboudi A.R.: Biotyping and enterotoxigenicity of Staphylococci isolated from fresh and frozen meat marketed in Jordan. Food Research International, 2009, 42, 3, 374-379.
4. Amagai M., Tsunoda K., Suzuki H., Nishifuji K., Koyasu S., Nishikawa T.: Use of autoantigen – knockout mice in developing an active autoimmune disease model for pemphigus. J. Clin. Invest. 2000, 105, 5, 625-631.
5. Arbuthnott J.P., Kent J., Lyel A., Gemmel C.G.: Toxic epidermal necrosis produced by an extracellular product of *Staphylococcus aureus*. Br. J. Derm. 1971, 85, 145-149.
6. Arbuthnott J.P., Kent J., Noble W.C.: The response of hairless mice to staphylococcal epidermolytic toxin. Br. J. Derm. 1973, 88, 481.
7. Arciola C.R., Campoccia D., Gamberini S., Baldassarri L., Montanaro L.: Prevalence of *cna*, *fnbA* and *fnbB* adhesin genes among *Staphylococcus aureus* isolates from orthopedic infections associated to different types of implant. FEMS Microbiology Letters. 2005, 246, 81-86.
8. Arvidson S., Eriksson R., Holme T., Möllby R., Wadström T., Vesterberg O.: Production and modification and partial characterization of staphylokinase. Contrib. Microbiol. Immunol. 1973, 1, 406-412.
9. Baird-Parker A.C.: A classification of micrococci and staphylococci based on physiological and biochemical tests. J. Gen. Microbiol. 1963, 30, 409-427.
10. Balaban N., Rasooly A.: Staphylococcal enterotoxins. Int. J. Food Microbiol. 2000, 61, 1-10.
11. Bannerman T.L.: Pulsed-field electrophoresis as a replacement for bacteriophage typing of *Staphylococcus aureus*. J. Clin. Microbiol. 1995, 33, 3, 531-555.
12. Bannerman T.L.: Staphylococcus, micrococcus, and other catalase – positive cocci that grow aerobically. W: Murray P.R., Baron E.J., Jorgensen M.A. (red.): Manual of Clinical Microbiology. 8th ed. ASM press. Washington: DC., 2003, s. 264-282.
13. Barber M.: Staphylococcal infection due to the penicillin-resistant strains. Br. Med. J. 1947, 2, 863-864.
14. Barski P., Piechowicz L., Galiński J., Kur J.: Rapid assay for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using multiplex PCR. Mol. Cell. Probes. 1996, 10, 471-475.
15. Belkessam Y., Benali M., Moulessehoul S., Harrach D.: Polyclonal antibodies production against *Staphylococcus aureus* protein A: ELISA technique optimization for milk quality control. African J. Biotech. 2010, 9, 5, 764-769.
16. Blair J.E., Williams R.E.O.: Phage typing of staphylococci. WHO Bulletin 1961, 24, 771-778.

17. Blouse L.E., Brockett R.M., Steele M.P., Ward E.R.: Colonization and infection of newborn infants caused by bacteriophage – group II *Staphylococcus aureus* strains. J. Clin. Microbiol. 1979, 10, 4, 604-606.
18. Bohach G.A., Fast D.J., Nelson R.D., Schlievert P.M.: Staphylococcal and streptococcal pyrogenic toxins involved in toxic shock syndrome and related illnesses. Crit. Rev. Microbiol. 1990, 17, 4, 251-272.
19. Bokarewa M.I., Jin T., Tarkowski A.: *Staphylococcus aureus*: staphylokinase. Int. J. Biochem. Cell. Biol. 2006, 38, 504-509.
20. Booth M., Wake M., Armstrong T., Chey T., Hesketh K., Mathur S.: The epidemiology of overweight and obesity among Australian children and adolescents, 1995-1997. Australian and New Zealand Journal of Public Health. 2001, 25, 162-169.
21. Bosch T., de Neeling A.J., Schouls L.M., van der Zwaluw K.W., Kluytmans J.A.J.W., Grundmann H., Huijsdens X.W.: PFGE diversity within the methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clonal lineage ST398. BMC Microbiology. 2010, 10, 40, 2-7.
22. Brumfitt W.M.D., Hamilton-Miller J.: Methicillin-resistance *Staphylococcus aureus*. N. Engl. J. Med. 1989, 320, 1188-1196.
23. de Buyser M.L., Dilasser F., Hummel R., Bergdoll M.S.: Enterotoxin and toxic shock syndrome toxin-1 production by Staphylococci isolated from goat's – milk. Int. J. Food Microbial. 1987, 5, 301-309.
24. Bülow P.: A new epidemic phage type of *Staphylococcus aureus*. 3. Occurrence and spread of "Type 6557", with special reference to the consumption of some antibiotics. Acta Pathol. Microbiol. Scand. 1968, 74, 543-560.
25. Canchaya C., Proux C., Fournous G., Bruttin A., Brüssow H. Prophage genomics. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2003, 67, 238-276.
26. Canchaya C., Fournous G., Brüssow H. The impact of prophages on bacterial chromosomes. Mol. Microbiol. 2004, 53, 9-18.
27. Cheung A.L., Wolf C., Yeaman M.R., Bayer A.S. International inactivation of a chromosomal locus that modulates expression of potential virulence determinants in *Staphylococcus aureus*. J. Bacteriol. 1995, 177, 3220-3226.
28. Christner R.B., Boyle M.D.: Role of staphylokinase in the acquisition of plasmin(ogen) – dependent enzymatic activity by staphylococci. J. Infect. Dis. 1996, 173, 1, 104-112.
29. Chung M., de Lencastre H., Matthews P., Tomasz A.: Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by pulsed – field gel electrophoresis: comparison of results obtained in a multilaboratory effort using identical protocols and MRSA strains. Microb. Drug Res. 2000, 6, 189-198.
30. Chung M., Dickinson G., de Lencastre H., Tomasz A.: International clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in two hospitals in Miami, Florida. J. Clin. Microbiol. 2004, 42, 2, 542-547.
31. CLSI (National Committee for Clinical Laboratory Standards). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. CLSI Document M100-S12. 12th Informational Supplement. Wayne, Pennsylvania, USA., 2002; 22, 1.
32. CLSI (National Committee for Clinical Laboratory Standards). Antimicrobial Susceptibility Testing: Method for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. 3 ed. Approved Standard. 1994, 13, 25.

33. Collery M.M., Smyth D.S., Twohig J.M., Shore A.C., Coleman D.C., Smyth C.J.: Molecular typing of nasal carriage isolates of *Staphylococcus aureus* from an Irish university student population based on toxin gene PCR, agr locus types and multiple locus variable number tandem repeat analysis. J. Med. Microbiol. 2008, 57, 348-358.
34. Conceição T., Aires de Sousa M., de Lencastre H.: Staphylococcal Interspersed Repeat Unit Typing of *Staphylococcus aureus*: Evaluation of a New Multilocus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis Typing Method. J. Clin. Microbiol. 2009, 47, 5, 1300-1308.
35. Connor B.L.: Impetigo contagiosa in the United Kingdom. BJD. 2006, 86, 8, 48-54.
36. Corrigan R.M., Miajlovic H., Foster T.J. Surface proteins that promote adherence of *Staphylococcus aureus* to human desquamated nasal epithelial cells BMC Microbiology. 2009, 9, 1-10.
37. Cribier B., Prevost G., Couppie P., Finck-Barbancon V., Grosshans E., Piemont Y.: *Staphylococcus aureus* leukocidin: a new virulence factor in cutaneous infections? An epidemiological and experimental study. Dermatology. 1992, 185, 175-180.
38. Crossley K., Landesman B., Zaske D.: An outbreak of infections caused by strains of *Staphylococcus aureus* resistant to methicillin and aminoglycosides. J. Infect. Dis. 1979, 139, 280-287.
39. Devriese L.A., Hommez J.: Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in dairy herds. Res. Vet. Sci. 1975, 19, 23-27.
40. Devriese L.A., van de Kerckhove A.: A comparison of methods used for testing staphylokinase (fibrinolysin) production in *Staphylococcus strains*. Antonie van Leeuwenhoek. 1980, 46, 5, 457-465.
41. Devriese L.A.: A simplified system for biotyping *Staphylococcus aureus* strains isolated from different animal species. J. Appl. Bacteriol. 1984, 56, 215-220.
42. Devriese L.A., Yde M., Godard C., Isigidi B.K.: Use of biotyping to trace the origin of *Staphylococcus aureus* in foods. Int. J. Food Microbiol. 1985, 2, 365-369.
43. Devriese L.A.: Staphylococci in healthy and diseased animals. J. Appl. Bacteriol. Symp. Supp. 1990, 71S-80S.
44. Duck W.M., Steward C.D., Banerjee S.N., McGowan J.E. Jr, Tenover F.C.: Optimization of computer software settings improves accuracy of pulsed – field gel electrophoresis macrorestriction fragment pattern analysis. J. Clin. Microbiol. 2003, 41, 3035-3042.
45. van Duijkeren E., Wolfhagen M.J, Box A.T, Heck M.E, Wannet W.J, Fluit A.C.: Human-to-dog transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Emerg. Infect. Dis. 2004, 10, 12, 2235-2237.
46. van Duijkeren E., Ikawaty R., Broekhuizen – Stins M.J., Jansen M.D., Spalburg E.C., de Neeling A.J., Allaart J.G., van Nes A., Wagenaar J.A., Fluit A.C.: Transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains between different kinds of pig farms. Vet. Microbiol. 2008, 126, 383-389.
47. Edwards S.J., Rippon J.E.: The characteristic and distribution of certain staphylococci pathogenic for the bovine udder. J. Comp. Path. 1957, 67, 111-125.
48. Elek S.D.: *Staphylococcus pyogenes* and its relation to disease. 1st edition. W: E & S Livingstone Ltd, Edinburgh 81, London. 1959, s. 304-308.

49. Enright M., Day N.P., Davies C.E., Peacock S.J., Spratt B.G.: Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. J. Clin. Microbiol. 2000, 38, 1008-1015.
50. Eriksen N.H.R., Hartzen S.H., Bangsbo J., Andersen L.P., Rosdahl V.T., Espersen F.: Changing patterns among the subgroups of strains of *Staphylococcus aureus* of phage group II in Danish hospitals from 1961-1991. Epidemiol. Infect. 1994, 112, 81-92.
51. Eriksen N.H.R., Espersen F., Rosdahl V.T., Jensen K.: Carriage of *Staphylococcus aureus* among 104 healthy persons during a 19-month period. Epidemiol. Infect. 1995, 115, 51-60.
52. Evans J.B. Genus *Staphylococcus*. W: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Breed RS, Murray E.G.D., Smith N.R. 7th ed. Baltimore: Williams and Wilkins, Baltimore. 1957, p. 464-466.
53. Faber M., Rosdahl V.T.: Changing pattern of phage group II *Staphylococcus aureus* infections: from community to hospital. Scand. J. Infect. Dis. 1993, 25, 647-653.
54. Feng Y., Chen C.J., Su L.H., Hu S., Yu J., Chiu C.H.: Evolution and pathogenesis of *Staphylococcus aureus*: lessons learned from genotyping and comparative genomics. FEMS Microbiol. Rev. 2008, 32, 23-37.
55. Finlay J.E., Millar L.A., Poupard J.A.: Interpretive criteria for testing susceptibility of staphylococci to mupirocin. Antimicrob. Agents Chemother. 1997, 41, 1137-1139.
56. Fisk R.T.: Studies on staphylococci. II. Identification of *Staphylococcus aureus* by means of bacteriophage. J. Infect. Dis. 1942, 71, 161-165.
57. Foster T.J., Hook M.: Surface protein adhesions of *Staphylococcus aureus*. Trends Microbiol. 1998, 12, 484-488.
58. Frenay H.M.E., Theelen J.P.G., Schouls L.M., Vandenbroucke – Grauls C.M.J.E., Verhoef J., van Leeuwen W.J., Mooi F.R.: Discrimination of epidemic and nonepidemic methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains on the basis of protein A gene polymorphism. J. Clin. Microbiol. 1994, 32, 3, 846-847.
59. Frénay H.M.E., Bunschoten A.E., Schouls L.M., van Leeuwen W.J., Vandenbroucke – Grauls C.M.J.E., Verhoef J., Mooi F.R.: Molecular typing of methicillin – resistant *Staphylococcus aureus* on the basis of protein A gene polymorphism. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 1996, 15, 60-64.
60. Galiński J.: *Staphylococcus aureus* strains of phage group II and their possible relation to animal staphylococci. Biochemical properties. Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A. 1976, 236, 10-15.
61. Galiński J., Szponar M., Bojanowska Z., Piechowicz L.: Five-year observation on *Staphylococcus aureus* phage types predominating in hospital environments. W: The Staphylococci. Jeliaszewicz J, Ciborowski P. (eds). Zbl Bakt Gustav Fischer Verlag, Stuttgart. New York, 1991, Suppl. 21. 473-474.
62. Garnier F., Tristan A., François B., Etienne J., Delage-Corre M., Martin Ch., Liassine N., Wannet W., Denis F., Ploy M.C. : Pneumonia and new methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone. Emerg. Infect. Dis. 2006, 12, 3, 498-500.

63. Grundmann H., Aanensen D.M., van den Wijngaard C.C., Spratt B.G., Harmsen D., Friedrich A.W.: Geographic Distribution of *Staphylococcus aureus* Causing Invasive Infections in Europe: A Molecular-Epidemiological Analysis PLOS Medicine. 2010, 7, 1, 1-15.
64. Hájek V., Maršálek E.: The differentiation of pathogenic staphylococci and a suggestion for their taxonomic classification. Zbl. Bakt. Hyg. I Abt Orig A 1971, 217, 176-182.
65. Hájek V., Maršálek E.: A comparison of phage pattern and antigenic structure with biochemical properties of *Staphylococcus aureus* strains isolated from cattle. Acta Path. Microbiol. Scand. Section B. 1971, 79, 357-361.
66. Hájek V., Maršálek E.: Evaluation of classificatory criteria for staphylococci. W: Staphylococci and Staphylococcal Diseases.. J. Jeliaszewicz, Stuttgart, New York, Gustaw Fischer Verlag, Suppl 5, 1976, 11-21.
67. Hajek V.: *Staphylococcus intermedius*, a new species isolated from animals. Int. J. Syst. Bacteriol. 1976, 26, 401-408.
68. Hallin M., Friedrich A.W., Struelens M.J.: Spa typing for epidemiological surveillance of *Staphylococcus aureus*. Methods Mol. Biol. 2009, 551, 189-202.
69. Hanakawa Y., Stanley J.R.: Mechanisms of blister formation by staphylococcal toxins. J. Biochem. 2004, 136, 747-750.
70. Harmsen D., Claus H., Witte W., Rothganger J., Turnwald D., Vogel U.: Typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a university hospital setting by using novel software for spa repeat determination and database management. J. Clin. Microbiol. 2003, 41, 5442-5448.
71. Hasman H., Moodley A., Guardabassi L., Stegger M., Skov R.L., Aarestrup F.M. Spa type distribution in *Staphylococcus aureus* originating from pigs, cattle and poultry. Vet. Microbiol. 2010, 141, 3-4, 326-331.
72. Hennekinne J.A., Kerouanton A., Brisabois A., de Buyser M.L.: Discrimination of *Staphylococcus aureus* biotypes by pulsed – field gel electrophoresis of DNA macrorestriction fragments. J. Appl. Microbiol. 2003, 94, 321-329.
73. Heym B., Le Moal M., Armand – Lefevre L., Nicolas – Chanoine M.H.: Multi-locus sequence typing (MLST) shows that the “Iberian” clone of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* has spread to France and acquired reduced susceptibility to teicoplanin. J. Antimicrob. Chemother. 2002. 5, 323-329.
74. Hoerlle J.L., Brandelli A.: Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from the intensive care unit of a general hospital in southern Brazil. J. Infect. Dev. Ctries. 2009, 3, 7, 504-510.
75. Holderbaum D., Spech T., Ehrhart L.A., Keys T., Hall G.S.: Collagen binding in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. J. Clin. Microbiol. 1987, 25, 2258-2261.
76. Holtfreter S., Grumann D., Schmudde M., Nguyen H.T.T., Eichler P., Strommenger B., Kopron K., Kolata J.S., Giedrys-Kalemba S., Steinmetz I., Witte W., Bröker B.M.: Clonal distribution of superantigen genes in clinical *Staphylococcus aureus* isolates. J. Clin. Microbiol. 2007, 45, 8, 2669-2680.
77. Hryniewicz W., Sulikowska A., Szczypa K., Skoczyńska A., Łuczak-Kadłubowska A., Gniadkowski M. Rekomendacje doboru testów do oznaczania wrażliwości bakterii na antybiotyki i chemioterapeutyki. Rekomendacje Warszawa. NIZP, 2006, 13-19.

78. Hudson M.C., Ramp W.K., Frankenburg K.P.: *Staphylococcus aureus* adhesion to bone matrix and bone – associated biomaterials. FEMS. 1999, 173, 279-284.
79. Isigidi B.K., Devriese L.A., Godard C., van Hoof J.: Characteristics of *Staphylococcus aureus* associated with meat products and meat workers. Lett. Appl. Microbiol. 1990, 11, 145-147.
80. Isigidi B.K., Mathieu A.M., Devriese L.A., Godard C., van Hoof J.: Enterotoxin production in different *Staphylococcus aureus* biotypes isolated from food and meat plants. J. Appl. Bacteriol. 1992, 72, 16-20.
81. Jackson G.G., Dowling H.F., Lepper M.H.: Bacteriophage typing of staphylococci. Epidemiologic studies among patients, household, contact and hospital personnel. J. Lab. Clin. Med. 1954, 44, 29-40.
82. Jeliaszewicz J., Switalski L.M., Adlam C.: Staphylocoagulase and clumping factor. W: C.C.F. Easmon and C. Adam (red.): Staphylococci and staphylococcal infections. T.2. London: Academic Press., 1983, s. 525-557.
83. Jessen O., Rosendal K., Büllow P., Faber V., Eriksen K.R.: Changing staphylococci and staphylococcal infections. A ten – year study of bacteria and cases of bacteremia. N. Engl. J. Med. 1969, 281, 627-635.
84. Jevons M.P.: Celbenin - resistant staphylococci Br. Med. J. 1961, I, 124-125.
85. Jevons M.P., Parker M.T.: The evolution of new hospital strains of *Staphylococcus aureus*. J. Clin. Path. 1964, 17, 243-250.
86. Jevons M.P., John M., Parker M.T.: Cultural characters of a newly recognized group of hospital staphylococci. J. Clin. Pathol. 1966, 19, 305-312.
87. Jin T., Bokarewa M., McIntyre L., Tarkowski A., Corey G.R., Reller L.B., Fowler V.G.Jr.: Fatal outcome of bacteraemic patients caused by infection with staphylokinase – deficient *Staphylococcus aureus* strains. J. Med. Microbiol. 2003, 52, 919-923.
88. Johansson A., Flock J.I., Svensson O.: Collagen and fibronectin binding in experimental staphylococcal osteomyelitis. Clin. Orthop. 2001, 382, 241-246.
89. Kania I., Osek J.: Metycylinooporny *Staphylococcus aureus* (MRSA) – występowanie u zwierząt a potencjalne zagrożenia zdrowia człowieka. Med. Wet. 2009, 65, 5, 301-305.
90. Kapral F.A., Millerm M.: Product of *Staphylococcus aureus* responsible for the scalded – skin syndrome. Infec. Immun. 1971, 4, 541-545.
91. Kerr S., Kerr G.E, Mackintosh C.A., Marples R.R.: A survey of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* affecting patients in England and Wales. J. Hosp. Infect. 1990. 16, 1, 35-48.
92. Kim S.H., Chun H.S., Han M.H., Park N.Y., Suk K.: A novel variant of staphylokinase gene from *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. Thrombosis Research. 1997, 87, 4, 387-395.
93. Kloos W.E., Schleifer K.H.: Simplified scheme for routine identification of human *Staphylococcus aureus* species. J. Clin. Microbiol.. 1975, 1, 82-88.
94. Knox R.: Celbenin resistant staphylococci Br. Med. J. 1961, I, 126-128.
95. Kocur M., Bergan T., Mortensen N.: DNA base composition of Gram-positive cocci. J. Gen. Microbiol. 1971, 69, 167-183.
96. Kondo I., Sakurai S., Sarai Y., Futaki S.. Two serotypes of exfoliatin and their distribution in staphylococcal strains isolated from patients with scalded skin syndrome J. Clin. Microbiol. 1975, 1, 397-400.

97. Kondo I., Sakurai S., Sarai J.: Staphylococcal exfoliatin A and B. Zbl. Bakt. Hyg I Abt Suppl. 1976, 5, 489.
98. Krawczyk B. Diagnostyka molekularna w zakażeniach szpitalnych. Post. Mikrobiol. 2007, 46, 367-378.
99. Kretzschmar W.: Some new aspects of serological typing of *Staphylococcus aureus*. Contrib. Microb. Immunol. 1973, 1, 509-514.
100. Kryński S., Niemiro A.: Classification of *Staphylococcus aureus* strains according to their bacteriophage susceptibility and in relation to the sources of the strains and their resistance to antibiotics. Acta Pathol. Microbiol. Scand. 1961, 4, 380-387.
101. Kryński S., Becla E., Bugalski R., Podhajska A., Samet A.: *Staphylococcus aureus* types isolated from hospital sources and from healthy carriers. Path. Microb. 1966, 29, 854-864.
102. Kryński S., Becla E., Galiński J., Samet A. *Staphylococcus aureus* strains isolated from patients at hospital centers in Gdańsk. Exp. Med. Microbiol. 1966, 18, 1-6.
103. Kryński S., Becla E.: Sensitivity to antibiotics and biochemical properties of *Staphylococcus aureus* 52, 42A, 80, 81 complex. Arch. Immunol. Ther. 1972, 20, 775-780.
104. Kryński S., Galiński J., Becla E.: Hospital phage types of *Staphylococcus aureus* predominating in Poland in years 1955-1975. W: J. Jeliaszewicz (red.): The staphylococci. Zbl. Bakt. Suppl. 14. Stuttgart, New York: Gustav Fischer Verlag., 1976, s. 1003-1011.
105. Kryński S., Becla E.: Phage types of *Staphylococcus aureus* occurring in Polish hospitals.. W: J. Jeliaszewicz (red.): The staphylococci. Zbl. Bakt. Suppl. 14. Stuttgart, New York: Gustav Fischer Verlag., 1985, s. 687-688.
106. Krzysztoń-Russjan J., Empel J., Lêski T., Gniadkowski M., Hryniewicz W. Clonal structure of the methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) population in Poland: revision and update. Microb. Drug. Resist. 2005, 11, 2, 127-136.
107. Krzywińska E., Piechowicz L., Galinski J.. Fagotypy *Staphylococcus aureus* na terenie Polski w latach 1994-1995. P. 244. Materiały naukowe XXIII Zjazdu Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów. 1996 OŁ PTM, Łódź.
108. Krzywińska E., Piechowicz L., Galiński J.: Dominacja II grupy fagowej wśród szczepów *Staphylococcus aureus* izolowanych od ludzi. Med. Dośw. Mikrobiol. 1999, 51, 25-30.
109. Krzywińska E., Galiński J.: Zanikanie różnic w oporności na antybiotyki szczepów *Staphylococcus aureus* izolowanych w szpitalach i ambulatoriach. Med. Dośw. Microbiol. 2004, 56, 2, 119-126.
110. Kuypers J.M., Proctor R.A.: Reduced adherence to traumatized rat heart valves by a low-fibronectin-binding mutant of *Staphylococcus aureus*. Infect. Immun. 1989, 57, 8, 2306-2312.
111. Ladhani S., Joannou C.L., Lochrie D.P., Evans R.W., Poston S.M.: Clinical, microbial and biochemical aspect of the exfoliative toxins causing staphylococcal scalded-skin syndrome. Clin. Microbiol. Rev. 1999, 12, 224-242.
112. Ladhani S., Joannou C.L.: Difficulties in the diagnosis and management of staphylococcal scalded skin syndrome. Pediatr. Infect. Dis. J. 2000, 142, 1251-1256.

-
113. Lähteenmäki K., Kuusela P., Korhonen T.K.: Bacterial plasminogen activators and receptors. *FEMS Microbiol. Rev.* 2001, 25, 531-552.
 114. Laurent F., Tristan A., Croze M., Bes M., Meugnier H., Lina G., Vandenesch F., Etienne J.: Presence of the epidemic European fusidic acid-resistant impetigo clone (EEFIC) of *Staphylococcus aureus* in France. *JAC.* 2008, 1, 1-2.
 115. Lawrence J.G., Hendrix R.W., Casjens S.: Where are the pseudogenes in bacterial genomes? *Trends Microbiol.* 2001, 9, 535-540.
 116. Lee J.H.: Methicillin (oxacillin) – resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from major food animals and their potential transmission to humans. *Appl. Environ. Microbiol.* 2003, 69, 11, 6489-6494.
 117. van Leeuwen W.B., Melles D.C., Alaidan A., Al-Ahdal M., Boelens H.A.M., Snijders S.V., Wertheim H., van Dujkeren E., Peeters J.K., van der Spek P.J., Gorkink R., Simons G., Verbrugh HA., van Belkum A.: Host- and tissue-specific pathogenic traits of *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 2005, 187, 13, 4584-4591.
 118. Leski T., Oliveira D., Trzciński K., Sanches I.S., de Sousa M.A., Hryniewicz W., de Lencastre H.: Clonal distribution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Poland. *J. Clin. Microbiol.* 1998, 36, 12, 3532-3539.
 119. Lewis H.C., Mølbak K., Reese C., Aarestrup F.M., Selchau M., Sørup M., Skov R.L.: Pigs as source of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* CC398 infections in humans, Denmark. *Emerg. Infect. Dis.* 2008, 14, 9, 1383–1389.
 120. van Loo I., Huijsdens X., Tiemersma E., de Neeling A., van de Sande-Bruinsma N., Beaujean D., Voss A., Kluytmans J.: Emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* of animal origin in humans. *Emerg. Infect. Dis.* 2007, 13(12), 1834-1839.
 121. Lina G., Piémont Y., Godail-Gamot F., Bes M., Peter M., Gauduchon V., Vandenesch F., Etienne J.: Involvement of Pantón-Valentine Leukocidin – Producing *Staphylococcus aureus* in Primary Skin Infections and Pneumonia. *Clin Infect Dis* 1999; 29: 1128-1132.
 122. Live I.: Differentiation of *Staphylococcus aureus* of human and of canine origins: coagulation of human and of canine plasma, fibrinolysin activity, and serological reaction. *Amer. J. Vet. Res.* 1972, 3, 385-391.
 123. Loeb L.: The influence of certain bacteria on the coagulation of the blood. *J. Med. Res.* 1903, 10, 407-419.
 124. Łuczak-Kadłubowska A., Sabat A., Tambic-Andrasevic A., Payerl-Pal M., Kszysztoń-Russjan J., Hryniewicz W.: Usefulness of Multiple-Locus VNTR Fingerprinting in detection of clonality of community- and hospital-acquired *Staphylococcus aureus*. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 2008, 94, 4, 543-553.
 125. Maiden MC. Multilocus sequence typing of bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 2006, 60, 561-588.
 126. Malachowa N., Sabat A., Gniadkowski M., Krzysztoń-Russjan J., Empel J., Miedzobrodzki J., Kosowska-Shick K., Appelbaum P.C., Hryniewicz W. : Comparison of multiple – locus variable number tandem-repeat analysis with pulsed-field gel electrophoresis, spa typing, and multilocus sequence typing for clonal characterization of *Staphylococcus aureus* isolates. *J. Clin. Microbiol.* 2005, 43, 3095-3100.

127. Maršálek E., Hájek V.: The classification of pathogenic staphylococci. W: *Staphylococci and Staphylococcal Infections. Recent Progress.* J. Jeliaszewicz, Basel, Karger S, 1973, 30-37.
128. Mehrotra M., Wang G., Johnson W.M.: Multiplex PCR for detection of genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin 1 and methicillin resistance. *J. Clin. Microbiol.* 2000, 38, 3, 1032-1035.
129. Mellmann A., Weniger T., Berssenbrügge Ch., Rothgänger J., Sammeth M., Stoye J., Harmsen D.: Based Upon Repeat Pattern (BURP): an algorithm to characterize the long-term evolution of *Staphylococcus aureus* populations based on *spa* polymorphisms. *BMC Microbiology.* 2007, 7, 98, 1-6.
130. Mellmann A., Weniger T., Berssenbrügge Ch., Keckevoet U., Friedrich A., Harmsen D., Grundmann H.: Characterization of clonal relatedness among the natural population of *Staphylococcus aureus* strains by using *spa* sequence typing and the BURP (Based upon Repeat Patterns) algorithm. *J. Clin. Microbiol.* 2008, 46, 8, 2805-2808.
131. Melles D.C., Gorkink R.F., Boelens H.A., Snijders S.V., Peeters J.K., Moorhouse M.J., van der Spek P.J., van Leeuwen W.B., Simons G., Verbrugh H.A., van Belkum A.: Natural population dynamics and expansion of pathogenic clones of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Invest.* 2004, 114, 1732-1740.
132. Melish M.E., Glasgow L.A.: The staphylococcal scalded-skin syndrome. *N. Engl. J. Med.* 1970, 282, 1114.
133. Meyer W.: Differenzierungsschema für Standortvarianten von *Staphylococcus aureus*. *Zbl. Bakt. Hyg. I Abt. Orig. A.* 1966a; 201, 465-481.
134. Meyer W.: Der Kristallviolett – Test, ein Hilfsmittel zur Auslese von *Staphylococcus aureus* - Stämmen der Var. bovis und Lyso-Gr. IV. *Z. Ges. Hyg.* 1967b.
135. Międzobrodzki J., Małachowa N., Markiewski T., Białecka A., Kasprówska A.: Różnicowanie izolatów *Staphylococcus aureus* w oparciu o cechy fenotypowe. *Post. Hig. Med. Dośw.* 2008, 62, 322-328.
136. Mitchell A.A.B.: New epidemic strain of *Staphylococcus aureus*. Emergence and spread in general hospital. *Lancet.* 1964, 1, 859-862.
137. Mongodin E., Bajolet O., Cutrona J., Bonnet N., Dupuit F., Puchelle E., Bentzmann S.: Fibronectin-binding proteins of *Staphylococcus aureus* are involved in adherence to human airway epithelium. *Infect. Immun.* 2002, 70, 2, 620–630.
138. Montanaro L., Arciola C.R., Baldassarri L. and Borsetti E.: Presence and expression of collagen adhesin gene (*cna*) and slime production in *Staphylococcus aureus* strains from orthopaedic prosthesis infections. *Biomaterials.* 1999, 20, 1945-1949.
139. Moodley A., Stegger M., Bagcigil A.F., Baptiste K.E., Loeffler A., Lloyd D.H., Williams N.J., Leonard N., Abbott Y., Skov R., Guardabassi L.: Spa typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from domestic animals and veterinary staff in the UK and Ireland. *J. Antimicrob. Chemother.* 2006, 58, 6, 1118-1123.
140. Moore P.C., Lindsay J.A.: Molecular characterization of the dominant UK methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains, EMRSA-15 and EMRSA-16. *J. Med. Microbiol.* 2002, 51, 516-521.

141. Moore P., Lindsay J.: Genetic variation among hospital isolates of methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*: evidence of horizontal transfer of virulence genes. J. Clin. Microbiol. 2001, 39, 2760-2767.
142. Morgan M.: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and animals: zoonosis or humanosis? J. Antimicrob. Chemoth. 2008, 62, 1181-1187.
143. Mölkanen T., Tyynelä J., Helin J., Kalkkinen N., Kuusela P.: Enhanced activation of bound plasminogen on *Staphylococcus aureus* by staphylokinase. FEBS Lett. 2002, 517, 72-78.
144. Musser J.M., Schlievert P.M., Chows A.W., Ewan P., Kreiswirth B.N., Rosdahl V.T., Naidu A.S., Witte W., Selander R.K.: A single clone of *Staphylococcus aureus* causes the majority of cases of toxic shock syndrome. Proc. Natl. Acad. Sci. 1990, 87, 225-229.
145. Nahmias A., Sakurai N., Blumberg R., Doege A., Sulzer C.: The staphylococcus "80/81 complex": epidemiological and laboratory observations. J. Infect. Dis. 1961, 109, 211-222.
146. Narmeen S.M., Jaladet M., Jubrael S.: Isolation and identification of *Staphylococcus aureus* using classical and molecular methods J. Duhok. Univ. 2009, 12, 1, 10-16.
147. de Neeling A.J., van den Broek M.J., Spalburg E.C., van Santen-Verheuevel M.G., Dam-Deisz W.D., Boshuizen H.C., van de Giessen A.W., van Duinkerken E., Huijsdens X.W.: High prevalence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in pigs. Vet. Microbiol. 2007, 122, 366-372.
148. Nieradko J., Łoś M.: Wpływ produktów kodowanych przez sekwencje moronowe fagów na wirulencję bakterii powszechnie izolowanych z materiałów klinicznych. Post. Mikrobiol. 2005, 44, 4, 329-339.
149. Nkwelang G., Francis J., Akoachere T.K., Kamga L.H., Nfoncham E.D., Ndip R.N.: *Staphylococcus aureus* isolates from clinical and environmental samples in a semi-rural area of Cameroon: phenotypic characterization of isolates. Afr. J. Microbiol. Res. 2009, 3, 11, 731-736.
150. Nolte O., Haag H., Zimmerman A., Geiss H.K.: *Staphylococcus aureus* positive for Panton-Valentine leukocidin genes but susceptible to methicillin in patients with furuncles. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 2005, 24, 477-479.
151. Novick R.P.: Pathogenicity factors and their regulation. W: Fuschetti V.A., Novick R.P., Ferretti J.J., Portnoy D.A., Roods J.I (eds): Gram – positive pathogens. Washington, DC: AMS Press, 2000, p. 392-407.
152. Nulens E., Stobberingh E.E., van Dessel H., Sebastian S., van Tiel F.H., Beisser P.S., Deurenberg R.H.: Molecular characterization of *Staphylococcus aureus* bloodstream isolates collected in a Dutch University Hospital between 1999 and 2006. J. Clin. Microbiol. 2008, 46, 7, 2438-2441.
153. Nwachukwu N.C., Orji F.A., Okike U.M.: Antibiotic susceptibility patterns of bacterial isolates from surgical wounds in Abia State University Teaching Hospital (ABSUTH), Aba - Nigeria. Res. J. Med. Med. Scien. 2009, 4, 2, 575-579.
154. Oeding P., Marandon J.L., Hájek V., Maršálek E.: Comparison of antigenic structure and phage pattern with biochemical properties of *Staphylococcus aureus* strains isolated from dogs and pigeons. Acta Path. Microbiol. Scand. Section B. 1970, 78, 414-420.
155. Oeding P., Marandon J.L., Meyer W., Hájek V., Maršálek E.: A comparison of phage pattern and antigenic structure with biochemical properties of *Staphylo-*

- coccus aureus* strains isolated from swine. Acta Path. Microbiol. Scand. Section B 1972, 80, 525-533.
156. Ogston A.: Über Abscesse. Archiv für Klinische Chirurgie 1880, 25, 588-600.
 157. Oliveira D.C., Tomasz A., de Lencastre H.: The evolution of pandemic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: identification of two ancestral genetic backgrounds and associated mec elements. Microb. Drug Resist. 2001, 7, 349-361.
 158. O'Neill G.C., Murchan S., Gil – Setas A., Auken H.M.: Identification and characterization of phage variants of a strain of epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (E-MRSA-15). J. Clin. Microbiol. 2001, 39, 1540-1548.
 159. O'Neill A.J., Larsen A.R., Skov R., Henriksen A.S, Chopra I.: Characterization of the epidemic European fusidic acid-resistant impetigo clone of *Staphylococcus aureus*. J. Clin. Microbiol. 2007, 45, 5, 1505-1510.
 160. Orczykowska – Kotyna M., Łuczak – Kadłubowska A., Marszałek N., Kozinska A., Empel J., Hryniewicz W.: Molecular characteristic of *Staphylococcus aureus* associated with bacteraemia in Poland during 2005. 19th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID) 2009.
 161. Panillo A.L.: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in U.S. hospitals 1975-1991. Infect. Control. Hosp. Epidemiol. 1992, 13, 582-586.
 162. Parker M.T. The significance of phage – typing patterns in *Staphylococcus aureus*. Staphylococci and Staphylococcal Infections. 1st ed. Academic press Inc London. 1983, 33-62.
 163. Parker M.T., Williams R.E.O.: Further observations on the bacteriology of impetigo and pemphigus neonatorum. Acta Paediatr. Scand. 1961, 50, 101-112.
 164. Parker M.T., Tomlinson A.J.H., Williams R.E.O.: Impetigo contagiosa. J. Hyg. (Camb). 1955, 53, 458-473.
 165. Passet J.: Über Mikroorganismen der eiterigen Zellgewebsentzündung des Menschen. Fortschr. Med. 1885, 3, 3.
 166. Patti J.M., Allen B.L., McGavin M.J., Höök M.: MSCRAMM – mediated adherence of microorganisms to host tissues. Annu. Rev. Microbiol. 1994, 48, 585-617.
 167. Pawińska A., Dzierżanowska D.: Epidemiologia zakażeń szpitalnych MRSA. Klinika Chorób Zakaźnych i Zakażenia Szpitalne. 1998, 2, 1,: 29-33.
 168. Peschel A., Otto M., Jack R.W., Kalbacher H., Jung G., Gotz F.: Inactivation of the *dlt* operon in *Staphylococcus aureus* confers sensitivity to defensins, protegrins, and other antimicrobials peptides. J. Biol. Chem. 1999, 274, 8405-8410.
 169. Pessione E., Giunta C. Distribution of methicillin-resistance and of protein A among *Staphylococcus aureus* strains isolated from different hosts. Microbios. 1988, 55, 224-225, 147-153.
 170. Piechowicz L., Galiński J., Dajnowska – Stanczewska A., Garbacz K.: Fagotypy *Staphylococcus aureus* izolowane w Polsce w latach 1999 – 2004. Med. Dośw. Mikrobiol. 2005, 57, 105-113.
 171. Plommet M., Plommet A.M.: Serotyping of bovine staphylococci. Ann. Inst. Pasteur (Paris). 1970, 118, 2, 143-157.
 172. Projan S.J., Novick R.P.: The molecular basis of pathogenicity. W: Crossley K.B., Archer G.L. (ed.): The staphylococci in human disease. Churchill Livingston, New York, N.Y. 1997; s. 55-81.

-
173. Ralston D.J., Baer B.S.: A new property of phage group II *Staphylococcus aureus* strains: Host restriction of phage K₁₄. J. Gen. Microbiol. 1964, 36, 1-16.
 174. Ramos A., Ley L., Muñoz E., Videl A., Sánchez Brain I.: Abscess due to Pantón-Valentine Leukocidin-Positive *Staphylococcus aureus*. Infection. 2009, 32, 4, 365-367.
 175. Richardson J.F., Rosdahl V.T., van Leeuwen W.J., Vickery A.M., Vindel A., Witte W.: Phages for methicillin – resistant *Staphylococcus aureus*: an international trial. Epidemiol. Infect. 1999, 122, 227-233.
 176. Rodgers J.D., McCullagh J.J., McNamee P.T., Smyth J.A., Ball H.J.: Comparison of *Staphylococcus aureus* recovered from personnel in a poultry hatchery and in broiler parent farms with those isolated from skeletal disease in broilers. Vet. Microbiol. 1999, 69, 189-198.
 177. Rooijackers S.H., Ruyken M., Roos A., Daha M.R., Presanis J.S., Sim R.B.: Immune evasion by a staphylococcal complement inhibitor that acts on C3 convertases. Nat. Immunol. 2005, 6, 920-927.
 178. Rooijackers S.H., van Wamel W.J., Ruyken M., van Kessel K.P., van Strijp J.A.: Anti – opsonic properties of staphylokinase. Microbes Infect. 2005, 7, 476-84.
 179. Rosdahl V.T., Laursen H., Bentzon M.W., Kjaeldgaard P., Thomsen M.: Colonization priority among *Staphylococcus aureus* strains – correlation with phage type. J. Hosp. Infect. 1988, 12, 151-162.
 180. Rosdahl V.T., Westh H., Jensen K.: Antibiotic susceptibility and phage type pattern of *Staphylococcus aureus* isolated strains from patients in general practice compared to strains from hospitalized patients. Scand. J. Infect. Dis. 1990, 22, 315-320.
 181. Rosdahl V.T., Bentzon M.W.: Epidemiological studies of *Staphylococcus aureus* strains in Danish hospitals in period 1975 - 1988. W: Jeliaszewicz J., Ciborowski P. (eds). The Staphylococci. Zbl. Bakt. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart. New York. 1991, Suppl. 21, 122-127.
 182. Rosenbach F.J.: Mikroorganismen bei den Wundinfektionskrankheiten des menschen. Wiesbaden: J.F. Bergmann. 1884.
 183. Roszczyk E.: A new epidemic phage type of *Staphylococcus aureus*. Scand. J. Infect. Dis. 1971, 3, 27-31.
 184. Rountree P.M., Thomson E.F.: Incidence of antibiotic – resistant staphylococci in a hospital. Lancet. 1952, 2, 262-264.
 185. Rountree P.M., Beard M. Further observations of infection with phage type 80 staphylococci in Australia. Med. J. Aust. 1958, 2, 789-795.
 186. Rountree P.M., Ashesow E. Further observations of changes in phage – typing pattern of type 80/81 staphylococci. J. Gen. Microbiol. 1961, 26, 111-122.
 187. Saunders N.A., Holmes A.: Multilocus Sequence Typing (MLST) of *Staphylococcus aureus*. W: Ji Y. (ed): Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Protocols. T. Methods in Molecular Biology. 2008, 391, 15, s. 71-85.
 188. Schennings T., Heimdahl A., Coster K., Flock J.I. Immunization with fibronectin binding protein from *Staphylococcus aureus* protects against experimental endocarditis in rats. Microb. Pathog. 1993, 15, 3, 227-236.
 189. Schleifer K.H., Kandler O.: Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. Bacteriol. Rev. 1972, 36, 407-477.

190. Schleifer K.H.: Gram-positive cocci, W; Sneath P.H.A., Mair N.S., Sharpe M.E., Holt J.G. (red.), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, T. 2. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, 1986, s. 999-1002.
191. Schlichting C., Branger C., Fournier J.M., Witte W., Boutonnier A., Wolz C., Goullet P., Doring G.: Typing of *Staphylococcus aureus* by pulsed-field gel electrophoresis, zymotyping, capsular typing, and phage typing resolution of clonal relationships. J. Clin. Microbiol. 1993, 31, 2, 227-232.
192. Schmitz F.J., Krey A., Sadurski R., Verhoef J., Milatovic D., Fluit AdC.: Resistance to tetracycline and distribution tetracycline resistance genes in European *Staphylococcus aureus* isolates. J. Antimicrob. Chemother. 2001, 47, 239-240.
193. Shabir S., Hardy K.J., Abbasi W.S., McMurray C.L., Malik S.A., Wattal Ch., Hawkey P.M.: Epidemiological typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from Pakistan and India. J. Med. Microbiol. 2010, 59, 330-337.
194. Shimizu A., Kawano J., Kimura S.: Biotyping of coagulase-positive *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus intermedius* strains isolated from various animals in Japan. Jpn. J. Vet. Sci. 1986, 48, 1227-1235.
195. Shopsin B., Gomez M., Montgomery S.O., Smith D.H., Waddington M., Dodge D.E., Bost D.A., Riehman M., Naidich S., Kreiswirth B.N. Evaluation of protein A gene polymorphic region DNA sequencing for typing of *Staphylococcus aureus* strains. J. Clin. Microbiol. 1999, 37, 3556-3563.
196. Sierra G.: A simple method for the detection of lipolytic activity of microorganisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. Antonie van Leeuwenhoek. 1957, 23, 15-22.
197. Skov R.L., Williams T.J., Pallesen L., Rosdahl V.T., Espersen F.: Beta-lactamase production and genetic location in *Staphylococcus aureus*: introduction of a β -lactamase plasmid in strains of phage group II. J. Hosp. Infect. 1995, 30, 2, 111-124.
198. Smith J.A., Willis A.T., O'Connor J.J.: New epidemic strains of *Staphylococcus aureus*. Lancet. 1965, 2, 772-773.
199. Smith S.I., Opere B., Goodluck H.T., Akindolire O.T., Folaranmi A., Odekeye O.M., Omonigbehin E.A. Antibiotic susceptibility pattern of *Staphylococcus* species isolated from telephone receivers. Singapore Med. J. 2009, 50, 2, 208-211.
200. Soussy C.J., Carret G., Cavallo J.D., Chardon H., Chidiac C., Choutet P., Courvalin P., Dabernat H., Drugeon H., Dubreuil L.: Antibigram Committee of the French Microbiology Society. Report 2000–2001. Pathol Biol (Paris) 2000, 48, 832-871.
201. Sperber W.H., Tatini S.R.: Interpretation of the tube coagulase test for identification of *Staphylococcus aureus*. Appl. Environ. Microbiol. 1975, 29, 4, 502-505.
202. Strommenger B., Bräulke C., Heuck D., Schmidt C., Pasemann B., Nübel U., Witte W.: *Spa* typing of *Staphylococcus aureus* as a frontline tool in epidemiological typing. J. Clin. Microbiol. 2008, 46, 574-581.
203. Struelens M.J., the Members of the European Study Group on Epidemiological Markers (ESGEM) of the European Society for Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID): Consensus guidelines for appropriate use and evaluation of microbial epidemiologic typing systems. Clin. Microbiol. Infect. 1996, 2, 2-11.

-
204. Sung J., Lloyd D.H., Lindsay J.A.: *Staphylococcus aureus* host specificity: comparative genomics of human versus animal isolates by multi – strain microarray. Microbiol. 2008, 154, 1949-1959.
 205. Taylor K., Podhajska A.: Plazmidy. W: Lassota Z. (red.): Biologia Molekularna. T.2. Warszawa PWN., 1987, s. 600-634.
 206. Tang Y.W.: Progress toward rapid and accurate *Staphylococcus aureus* strain typing. Clin. Chem. 2009, 55, 2074-2076.
 207. Tenover S.C., Arbeit R., Archer G., Biddle J., Byrne S., Goering R., Hancock G., Hebert A., Hill B., Hollis R.: Comparison of traditional and molecular methods of typing isolates of *Staphylococcus aureus*. J. Clin. Microbiol. 1994, 32, 407-415.
 208. Tenover F.C., Arbeit R.D., Goering R.V., Mickelsen P.A., Murray B.E., Persing D.H., Swaminathan B.: Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed – field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. J. Clin. Microbiol. 1995, 33, 2233-2339.
 209. Thompson R.L., Cabezudo I., Wenzel R.P.: Epidemiology of nosocomial infection caused by methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. Ann. Intern. Med. 1982, 97, 639-642.
 210. Townsend D.E., Grubb W.B., Ashdown N.: Genetics of drug resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from Australian hospitals. J. Hosp. Infect. 1983, 4, 331-337.
 211. Tristan A., Ying L., Bes M., Etienne J., Vandenesch., Lina G.: Use of multiplex PCR to identify *Staphylococcus aureus* adhesions involved in human hematogenous infections. J. Clin. Microbiol. 2003, 41, 9, 4465-4467.
 212. Trzcinski K., Cooper B.S., Hryniewicz W., Dowson C.G.: Expression of resistance to tetracyclines in strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J. Antimicrob. Chemother. 2000, 45, 763-770.
 213. Tung H., Guss B., Hellman U., Persson L., Rubin K., Ryden C.: A bone sialoprotein-binding protein from *Staphylococcus aureus* a member of the staphylococcal *Sdr* family. Biochem. J. 2000, 345, 611-619.
 214. Vancraeynest D., Hermans K., Haesebrouck F.: Genotypic and phenotypic screening of high and low virulence *Staphylococcus aureus* isolates from rabbits for biofilm formation and MSCRAMMs. Vet. Microbiol. 2004, 103, 3-4, 241-247.
 215. Vogelsang Th.M., Böe J.: A long - term staphylococcal study. Acta Pathol. Microbiol. Scand. 1961, 54, 225-240.
 216. Waldron D.E., Lindsay J.A.: *SauI*: a novel lineage-specific type I restriction-modification system that blocks horizontal gene transfer into *Staphylococcus aureus* and between *S. aureus* isolates of different lineages. J. Bacteriol. 2006, 188, 15, 5578-5585.
 217. Weese J.S., Caldwell F., Willey B.M., Kreiswirth B.N., McGeer A., Rousseau J., Low D.E.: An outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* skin infections resulting from horse to human transmission in a veterinary hospital. Vet. Microbiol. 2006, 114, 1-2, 160-164.
 218. Więckowska – Szakiel M., Sadowska B., Rozalska B.: Staphylokinase production by clinical *Staphylococcus aureus* strains. Polish J. Microbiol. 2007, 56, 2, 97-102.

- 219. Williams J.R.B., Talbot E.C.S., Maughan E.: Hospital outbreak of cross - infection due to *Staphylococcus pyogenes* phage type 80. Br. Med. J. 1959, 34, 1374-1378.
- 220. Wilson G.S., Atkinson J.D.: Typing of staphylococci by the bacteriophage method. Lancet. 1945, I, 647-648.
- 221. Winkler K.C., de Waart J., Grooten C., Zegers B.J.M., Tellier N.F., Vertregt C.D.: Lysogenic conversion of staphylococci to loss of β -toxin. J. Gen. Microbiol. 1965, 39, 321-333.
- 222. Wiśniewska U., Galiński J.: Typy bakteriofagowe gronkowców złocistych w oddziałach noworodkowych województwa gdańskiego w latach 1984 – 1991. Med. Dośw. Mikrobiol. 1993, 45, 277-279.
- 223. Yamasaki O., Yamaguchi T., Sugai M., Chapuis-Cellier C., Arnaud F., Vandenesch F., Etienne J., Lina G.: Clinical manifestations of Staphylococcal Scalded-Skin Syndrome depend on serotypes of exfoliative toxins. J. Clin. Microbiol. 2005, 43, 4, 1890-1893.
- 224. Ziółkowski G., Krawczyk L., Dudzińska G., Daczyńska-Herman A., Nolewajka E., Ekiel A., Rogala – Zawada D.: Bakteryjne czynniki etiologiczne zakażeń u chorych leczonych w Klinicznym Oddziale Anestezjologii i Intensywnej Terapii. Med. Dośw. Mikrobiol. 1993, 45, 2, 223-228.
- 225. Żabicka D., Hryniewicz W.: Rekomendacje doboru testów do oznaczania wrażliwości bakterii na antybiotyki i chemioterapeutyki 2009. KORLD s. 1-18.

8. STRESZCZENIE

Gronkowce złociste są ważnymi patogenami zarówno dla ludzi jak i dla zwierząt. Można wśród nich wyróżnić biotyp ludzki i biotypy charakteryzujące szczepy zwierzęce. W latach 90. Isigidi i wsp. wykryli nowy biotyp P-like pA+, który najczęściej występował w produktach mięsnych i u osób zawodowo związanych z ich produkcją. W odróżnieniu od szczepów ludzkich, gronkowce biotypu P-like pA+ nie wytwarzały fibrynolizyny. Jak dotąd pochodzenie tych szczepów nie zostało określone. Obecna praca jako pierwsza bada populację fibrynolizynoujemnych szczepów biotypu P-like pA+ izolowaną od hospitalizowanych pacjentów i tych spoza środowiska szpitalnego.

Celem obecnej pracy było zbadanie, czy fibrynolizynoujemne szczepy *Staphylococcus aureus* II grupy fagowej różnią się od pozostałych gronkowców tej grupy pod względem cech genetycznych i fenotypowych oraz czy gronkowce niewytwarzające fibrynolizyny są spokrewnione ze szczepami zwierzęcymi.

Badania przeprowadzono na 112 izolatach *Staphylococcus aureus* II grupy fagowej pochodzących od pacjentów z 10 szpitali położonych w Gdańsku i województwie pomorskim oraz od osób zdrowych spoza środowiska szpitalnego (nosiciele). Szczepy uzyskano z różnych materiałów klinicznych. Dodatkowo do badań włączono grupę 22 gronkowców złocistych pochodzących od świń i drobiu, które w świetle dostępnej literatury są najbardziej zbliżone do gronkowców izolowanych od ludzi [59].

Identyfikację gatunkową przeprowadzono na podstawie obecności czynnika CF i koagulazy oraz testu Api ID 32 Staph. Szczepy II grupy fagowej wyselekcjonowano przez typowanie podstawowym zestawem 23 bakteriofagów. Przy określaniu biotypów wykorzystano wyniki czterech testów (wytwarzanie fibrynolizyny, β -hemolizyny, ścinanie plazmy bydlęcej, typ wzrostu na podłożu z fioletem krystalicznym). Dodatkowo oznaczono wytwarzanie białka A w celu odróżnienia szczepów biotypu P-like pA+ (*Poultry like protein A positive*) od biotypu drobiowego (*Poultry*). Do analizy struktury klonalnej szczepów II grupy fagowej oraz zbadania ich pokrewieństwa z gronkowcami pochodzącymi od zwierząt wykorzystano typowanie genetyczne całego bakteryjnego DNA metodą PFGE oraz typowanie genu *spa*. W celu określenia potencjału chorobotwórczego zbadano obecność genów toksyn i adhezyn gronkowcowych w oparciu o reakcje multiplex PCR. Oznaczenie wrażliwości na wybrane antybiotyki wykonano przy użyciu metody dyfuzyjno-krażkowej, a dla tetracykliny dodatkowo określając wartość MIC.

Badania przeprowadzone w obecnej pracy wykazały, że wśród gronkowców II grupy bakteriofagowej przeważają fibrynolizynoujemne szczepy należące do biotypu P-like pA+ (58,9%). Pozostałe gronkowce II grupy wytwarzały fibrynolizynę i należały do biotypu ludzkiego.

Wyizolowane od hospitalizowanych pacjentów gronkowce biotypu P-like pA+ regionu gdańskiego dotychczas nie były opisywane w środowisku szpitalnym. Przeprowadzone badania wykazały, że brak zdolności wytwarzania fibrynolizyny w szczepach biotypu P-like pA+ związany jest z ujemnym testem na obecność genu kodującego fibrynolizynę (*sak*).

Analiza makrorestrykcyjna (PFGE) ujawniła w obrębie biotypu P-like pA+ jeden klon PFGE, a sekwencjonowanie genu *spa* wykazało obecność spokrewnionych szczepów tworzących jeden kompleks klonalny *spa*-CC346/084. W odróżnieniu od biotypu P-like pA+, gronkowce biotypu ludzkiego były bardziej zróżnicowane genetycznie. Nale-

żały do kilkunastu klonów PFGE, z których tylko część tworzyła jeden kompleks klonalny: spa-CC (CC435).

Wśród gronkowców P-like pA⁺, w przeciwieństwie do szczepów ludzkich, nie wykryto genów związanych z wytwarzaniem toksyn i posiadały one mniejszą liczbę genów kodujących adhezyny, co wskazuje na ich niższy potencjał chorobotwórczy. W szczepach ludzkich przeważały geny toksyn związanych z zakażeniami skóry (*eta*, *etb*, *lukS-PV/lukF-PV*) i geny adhezyn występujące w określonych typach zakażeń (*bbp*, *cna*). W szczepach P-like pA⁺, w przeciwieństwie do gronkowców ludzkich, odnotowano dominację genu białka wiążącego fibronektynę (*fnbB*), co tłumaczy izolowanie ich z różnych rodzajów zakażeń.

Przeprowadzone badania wykazały, że gronkowce P-like pA⁺, oprócz braku zdolności wytwarzania fibrynolizyny, różnią się także innymi właściwościami fenotypowymi od szczepów ludzkich. Szczepy P-like pA⁺ nie rozkładały laktozy, nie były wrażliwe na faga 71 i częściej wykazywały oporność na tetracyklinę niż gronkowce ludzkie.

Analiza przeprowadzona w obecnej pracy wykazała, że gronkowce P-like pA⁺ występują w różnych materiałach klinicznych i to z wysoką częstością. Wyjątkiem były materiały pochodzące z zakażeń skóry, w których szczepy P-like pA⁺ – w porównaniu do szczepów ludzkich – były mniej liczne.

Porównanie szczepów P-like pA⁺ z gronkowcami zwierzęcymi przy wykorzystaniu metod genetycznych dowiodło, że są to grupy szczepów niespokrewnione ze sobą. Ze względu na brak pokrewieństwa ze szczepami zwierzęcymi, wrażliwość na bakteriofagi zestawu podstawowego dla szczepów ludzkich oraz budowę genu białka A (*spa* t084), należy przyjąć, że pochodzą od gronkowców ludzkich, które utraciły gen *sak* odpowiedzialny za wytwarzanie fibrynolizyny.

Obecna praca wykazała, że dotychczas opisywane w środowisku zwierzęcym szczepy biotypu P-like pA⁺ są obecne również u ludzi, w różnego rodzaju zakażeniach. Mimo, że cechują się niskim potencjałem chorobotwórczym i lekoopornością, ich liczne występowanie wśród hospitalizowanych pacjentów jak i u nosicieli pozaszpitalnych świadczy o łatwości rozprzestrzeniania się i konieczności traktowania szczepów biotypu P-like pA⁺ jako istotnego patogenu człowieka.

9. SUMMARY

Staphylococcus aureus is an important pathogen both for people and animals. The strains of this species are divided into a human biotype and animal biotypes. In 1990s, Isigidi et al. found a new biotype P-like pA⁺ which was most frequently isolated from meat products and people professionally engaged with their production. Unlike human biotype, staphylococci of P-like pA⁺ didn't produce staphylokinase. Until now, the origin of these strains is not proved. This study, as the first one investigates the population of staphylokinase-negative P-like pA⁺ biotype strains, which were isolated from hospitalized patients and outpatients.

The main purpose of the work was to examine whether staphylokinase-negative *Staphylococcus aureus* strains of phage group II differ from other staphylococci of this group in terms of genetic and phenotypic features and whether staphylokinase-negative staphylococci are related to strains isolated from animals.

The studies were conducted on 112 *Staphylococcus aureus* isolates of phage group II isolated from patients of 10 hospitals located in Gdansk area and from healthy people (carriers). The strains were obtained from different clinical materials. Additionally, a group of 22 *Staphylococcus aureus* isolates from pigs and poultry, which according to the available literature are the most similar to staphylococci isolated from people [59], were enclosed to the research.

Species identification was determined according to the presence of CF and coagulase and with the use of Api ID 32 Staph test. The strains of phage group II were selected by the typing with the basic set of 23 bacteriophages. The results of four tests (staphylokinase production, β -hemolysin production, coagulation of bovine plasma, type of growth on cristal violet agar plates) were used for the biotype determinaton. Additionally, the protein A was detected to differenciate the strains of biotypes: P-like pA⁺ from Poultry. In order to evaluate the clonal structure of phage group II strains and to assess the genetic similarities with animal staphylococci, the genetic typing of whole bacterial DNA was performed with the use of PFGE method and *spa* gene typing. In order to evaluate virulence potential the occurrence of staphylococcal toxin and adhesin genes was done basing on a multiplex PCR reaction. Antibiotic susceptibility testing to selected antibiotics in clonal complexes was performed using the disk diffusion method and additionally for tetracycline MIC value estimation was done.

The studies in the present study have shown that among staphylococci of phage group II, staphylokinase-negative strains belonging to biotype P-like pA⁺ (58.9%) prevail. Other staphylococci of group II were staphylokinase-positive and belonged to human biotype.

The staphylococci of P-like pA⁺ biotype were isolated from hospitalized patients of Gdansk area and yet not described in hospital. The studies in the present study have shown that the lack of ability to produce staphylokinase in P-like pA⁺ strains is associated with negative result of the test for the presence of gene encoding staphylokinase (*sak*).

Macrorestriction analysis (PFGE) revealed one PFGE clone in P-like pA⁺ biotype and sequencing of *spa* gene showed the presence of strains which are related in one clonal complex spa-CC346/084. Unlike biotype P-like pA⁺ staphylococci of human biotype were more genetically varied. They belonged to several PFGE clones, while only some of them created one clonal complex spa-CC (CC435).

Among the P-like pA⁺ staphylococci, unlike human strains, there were no genes involved in the toxin production and the strains had fewer genes of adhesin, which points to their lower virulence potential. In human strains, toxin genes connected with skin infections (*eta*, *etb*, *lukS-PV/lukF-PV*) and adhesin genes connected with distinctive types of infections (*bbp*, *can* and *ebp*) prevailed. In P-like pA⁺ strains, unlike in human staphylococci, the domination of gene of coding fibronectin binding protein (*fnbB*), which points to their isolation from different infections, was observed.

The studies have shown that P-like pA⁺ staphylococci, beside the lack of staphylokinase production ability, differ from human strains also in other phenotypic features. Strains of these group did not ferment lactose and were not susceptible to 71 phage and they were resistant to tetracycline more often than human strains.

The analysis in the present study has shown that P-like pA⁺ staphylococci are present with high frequency in different clinical materials. Materials from skin infections, in which P-like pA⁺ strains were less frequent than in human strains, were the exception.

The compare of P-like pA⁺ strains with animal staphylococci using genetic methods has shown that they do not show a relationship with the animal strains, the sensitivity to basic set of bacteriophages for human strains and the structure of protein A gene (*spa* t084), it must be assumed that they come from human staphylococci that lost *sak* gene responsible for staphylokinase production.

Present study has shown that P-like pA⁺ biotype strains described as existing in animal environment are also present in human with different kinds of infections. Despite of their low virulence potential and antibiotic resistance, their numerous presence in hospitalized patients and outpatients (carriers) proves that they disseminate easily and should be treated as an important human pathogen.