

GDAŃSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY

Katarzyna Garbacz

**ANALIZA WYSTĘPOWANIA WYBRANYCH CZYNNIKÓW
PATOGENNOŚCI KOAGULAZODODATNICH
GRONKOWCÓW POCHODZĄCYCH ZE ZMIAN
CHOROBYCH I OD NOSICIELI, Z UWZGLĘDNIENIEM
STAPHYLOCOCCUS AUREUS FAGOTYPU 187**

Rozprawa habilitacyjna

**Zakład Mikrobiologii Lekarskiej
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego
Kierownik: dr hab. Lidia Piechowicz**

GDAŃSK 2013

Wydano za zgodą
Senackiej Komisji Wydawnictw
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

Wydawca: Gdański Uniwersytet Medyczny
Druk: Sekcja ds. Wydawnictw GUMed
Gdańsk, ul. Marii Skłodowskiej-Curie 3a

Zlecenie KW/101/13

*Wyrażam podziękowania Panu Profesorowi
Januszowi Galińskiemu za cenne uwagi i inspirujące
dyskusje na temat prowadzonych badań*

SPIS TREŚCI

WYKAZ UŻYWANYCH SKRÓTÓW	7
WYKAZ PRAC BĘDĄCYCH PRZEDMIOTEM ROZPRAWY HABILITACYJNEJ	8
1. WSTĘP.....	9
1.1. Wprowadzenie.....	9
1.2. Klasyfikacja koagulazododatnich gronkowców.....	9
1.3. <i>S. aureus</i> fagotypu 187.....	11
1.4. Nosicielstwo <i>S. aureus</i> i <i>S. pseudintermedius</i>	11
1.5. Patogenność <i>S. aureus</i> i <i>S. pseudintermedius</i>	14
2. CELE PRACY	17
3. MATERIAŁ I METODY.....	18
3.1. Pozyskiwanie szczepów gronkowców	18
3.2. Szczepy wzorcowe	18
3.3. Identyfikacja biochemiczna.....	19
3.4. Identyfikacja genetyczna.....	19
3.4.1. Wykrywanie genu termostabilnej nukleazy <i>nucSA</i>	19
3.4.1.1. Izolowanie DNA	19
3.4.1.2. Reakcja PCR.....	20
3.4.1.3. Elektroforeza produktu PCR.....	20
3.4.2. Identyfikacja <i>S. pseudintermedius</i> metodą polimorfizmu fragmentów restrykcyjnych (PCR-RFLP) genu <i>pta</i>	21
3.5. Czynniki patogenności wykrywane fenotypowo	21
3.5.1. Wykrywanie czynnika zlepnego (CF).....	21
3.5.2. Koagulowanie osocza ludzkiego, króliczego i psiego	22
3.5.3. Wykrywanie termostabilnej DNazy	22
3.5.4. Oznaczanie wytwarzania hemolizyny β	22
3.5.5. Wykrywanie fibrynolizyny	23
3.5.6. Oznaczanie wytwarzania białka A	23
3.5.7. Oznaczanie właściwości lipolitycznych.....	24
3.5.8. Badanie wytwarzania biofilmu.....	24
3.6. Wykrywanie genów toksyn metodą PCR.....	25
3.6.1. Wykrywanie genów enterotoksyn <i>S. aureus</i>	25
3.6.2. Wykrywanie genów eksfoliatyn i toksyny wstrząsu toksycznego <i>S. aureus</i>	25
3.6.3. Wykrywanie genów leukocydyny PV <i>S. aureus</i>	25
3.6.4. Wykrywanie genów enterotoksyn i toksyny wstrząsu toksycznego wśród szczepów <i>S. pseudintermedius</i>	26
3.6.5. Wykrywanie genu eksfoliatyny <i>S. pseudintermedius</i>	26
3.6.6. Wykrywanie genów leukotoksyny <i>S. pseudintermedius</i>	27
3.7. Wykrywanie grup <i>agr</i> wśród szczepów <i>S. aureus</i>	27
3.8. Sekwencjonowanie genu <i>sec</i>	27
3.9. Różnicowanie szczepów <i>S. aureus</i> metodą polimorfizmu fragmentów restrykcyjnych (PCR/RFLP) genu <i>coa</i>	28
3.10. Różnicowanie szczepów <i>S. aureus</i> metodą polimorfizmu fragmentów restrykcyjnych (PCR/RFLP) genu <i>spa</i>	28

3.11.	Różnicowanie szczepów <i>S. aureus</i> metodą elektroforezy pulsacyjnej w zmiennym polu elektrycznym (PFGE).....	29
3.11.1.	Trawienie enzymem restrykcyjnym i rozdział elektroforetyczny.....	29
3.11.2.	Analiza wzorów restrykcyjnych.....	30
3.12.	Typowanie fagowe	30
3.13.	Obliczenia statystyczne	31
4.	OMÓWIENIE WYNIKÓW	32
4.1.	Ocena występowania wybranych genów toksyn oraz zróżnicowania w systemie regulacji ekspresji (<i>agr</i>) wśród szczepów <i>S. aureus</i> pochodzących ze zmian chorobowych i od nosicieli u ludzi [Praca 3, 4, 5, 7].....	32
4.2.	Ocena występowania wybranych markerów chorobotwórczości wśród szczepów <i>S. pseudintermedius</i> pochodzących ze zmian chorobowych i od nosicieli u psów [Praca 2]	35
4.3.	Występowanie genów toksyn wśród gronkowców złocistych fagotypu 187 oraz analiza polimorfizmu fragmentów restrykcyjnych <i>pta/MboI</i> [Praca 6 i 1] ...	37
5.	PODSUMOWANIE	41
6.	WNIOSKI	42
7.	PIŚMIENNICTWO	43
8.	PRACE BĘDĄCE PRZEDMIOTEM ROZPRAWY	51

WYKAZ UŻYWANYCH SKRÓTÓW

agr – *accessory gene regulator*

BSA – *bovine serum albumin* / albumina plazmy bydlęcej

CF – *clumping factor* / czynnik zlepnący

CFU – *colony forming unit* / jednostka tworząca kolonie

DTP – *deoxynucleotides dATP, dDTP, dGTP, dTTP*

Multiplex PCR – *multiplex polymerase chain reaction* / złożona łańcuchowa reakcja polimerazy

ETA – *exfoliative toxin A* / eksfoliatyna typu A

ETB – *exfoliative toxin B* / eksfoliatyna typu B

Luk-I – *leukotoxin I* / leukotoksyna I

PCR – *polymerase chain reaction* / łańcuchowa reakcja polimerazy

PFGE – *pulsed-field gel electrophoresis* / elektroforeza w zmiennym polu elektrycznym

PVL – *Panton Valentine leukocidin* / leukocydyna Panton-Valentine

RTD – *routine test dilution*

RFLP – *restriction fragment length polymorphism* / polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych DNA

SE – *staphylococcal enterotoxins* / enterotoksyny gronkowcowe

SIG – *Staphylococcus intermedius group* / grupa *Staphylococcus intermedius*

SIET – *Staphylococcus intermedius exfoliative toxin* / eksfoliatyna *Staphylococcus intermedius*

SSSS – *staphylococcal scalded skin syndrome* / zespół oparzonej skóry

TBS – *Tris buffered saline*

TSA – *Tryptic Soy Agar* / podłoże agarowe tryptozowo-sojowe

TSB – *Tryptic Soy Broth* / podłoże bulionowe tryptozowo-sojowe

TSS – *toxic shock syndrome* / zespół wstrząsu toksycznego

TSST-1 – *toxic shock syndrome toxin* / toksyna zespołu wstrząsu toksycznego

UPGMA – *unweighed pair group method with arithmetic averages*

WYKAZ PRAC BĘDĄCYCH PRZEDMIOTEM ROZPRAWY HABILITACYJNEJ

1. **Garbacz K.** and Piechowicz L.: Phage type 187 as a separate subunit *MboI* restriction site within the *Staphylococcus aureus* species. *Curr. Microbiol.* 2013, 66, 578-581. [IF: 1,815]
2. **Garbacz K.**, Żarnowska S., Piechowicz L., Haras K.: Pathogenicity potential of *Staphylococcus pseudintermedius* strains isolated from canine carriers and from dogs with infection signs. *Virulence* 2013, 4, 1-5. [IF: 2,264]
3. **Garbacz K.**, Piechowicz L., Barańska-Rybak W., Dąbrowska-Szponar M.: *Staphylococcus aureus* isolated from patients with recurrent furunculosis carrying Panton-Valentine leukocidin genes represent *agr* specificity group IV. *Eur. J. Dermatol.* 2011, 21, 43-46. [IF: 2,526]
4. Piechowicz L., **Garbacz K.**, Wiśniewska K., Dąbrowska-Szponar M.: Screening of *Staphylococcus aureus* nasal strains isolated from medical students for toxin genes. *Folia Microbiol.* 2011, 56, 225-229. [IF: 0,677]
5. **Garbacz K.**, Piechowicz L., Wiśniewska K., Dąbrowska-Szponar M.: Zróżnicowanie locus *agr* wśród *Staphylococcus aureus* izolowanych od nosicieli oraz od chorych z objawami zakażenia. *Med. Dośw. Mikrobiol.* 2009, 61, 5-9.
6. Piechowicz L., **Garbacz K.**, Galiński J.: *Staphylococcus aureus* of phage type 187 isolated from people occurred to be a genes carrier of enterotoxin C and toxic shock syndrome toxin-1 (TSST-1). *Int. J. Hyg. Environ. Health.* 2008, 211, 273-282. [IF: 2,158]
7. **Garbacz K.**, Piechowicz L., Dajnowska-Stanczewska A.: Występowanie wybranych genów enterotoksyn i toksyny wstrząsu toksycznego TSST-1 wśród wrażliwych i opornych na metycylinę gronkowców złocistych izolowanych z próbek materiału klinicznego. *Med. Dośw. Mikrobiol.* 2007, 59, 201-206.

Ogółem IF: 9,44

1. WSTĘP

1.1. Wprowadzenie

Zakażenie jest zjawiskiem złożonym i wieloetapowym, w którym biorą udział dwa organizmy żywe. Z jednej strony człowiek wraz z całym zespołem mechanizmów obronnych, z drugiej mikroorganizm dysponujący czynnikami, które pozwalają te mechanizmy neutralizować. W zależności od przewagi jednej ze stron, drobnoustrój zostaje zniszczony lub też dochodzi do zakażenia, które może przebiegać w sposób objawowy lub pozostawać w stanie nosicielstwa. Wspomniane zjawiska są przedmiotem badań od wielu lat i wraz z postępem technik badawczych stają się coraz bardziej zrozumiałe. Jednak ciągle nie są jasne różnice pomiędzy bakteriami pozostającymi w stanie nosicielstwa, a tymi które wywołują objawy chorobowe. Ma to szczególne znaczenie w przypadku koagulazododatnich gronkowców, które stały się w ostatnich dziesięcioleciach jedną z najgroźniejszych przyczyn zakażeń zarówno ludzi jak i zwierząt.

Głównym zamierzeniem cyklu prezentowanych prac było zbadanie wybranych czynników patogenności wśród koagulazododatnich gronkowców, pochodzących ze zmian chorobowych oraz z przypadków nosicielstwa. Nie ograniczając się jedynie do gronkowców izolowanych od ludzi badaniami objęto również populację gronkowców pochodzących od psów, a także gronkowce złociste fagotypu 187 mogące zakażać zarówno ludzi jak i psy.

1.2. Klasyfikacja koagulazododatnich gronkowców

Rodzaj *Staphylococcus* został opisany ponad 130 lat temu przez szkockiego badacza Ogstona [73]. Pierwsza klasyfikacja Rosenbacha rozróżniała w obrębie rodzaju *Staphylococcus* dwa gatunki: *Staphylococcus pyogenes aureus* – tworzący pomarańczowożółte kolonie i *Staphylococcus pyogenes albus* – o barwie białej [88]. Niedługo potem barwa kolonii, jako zmienna cecha stała się mniej istotnym kryterium klasyfikacyjnym. Za ważniejsze uznano wykrzepianie plazmy, wykryte przez Loeba w 1903 roku [65]. Znalazło to odzwierciedlenie w VII wydaniu klucza Bergey’ a, gdzie koagulaza była podstawowym kryterium różnicowania gronkowców i wyznacznikiem ich patogenności [32]. Wyodrębniono chorobotwórczy, wytwarzający koagulazę gatunek *S. aureus* oraz niechorobotwórczy, koagulazoujemny *S. epidermidis* [32]. Ten uproszczony podział w kolejnych latach ulegał modyfikacjom. W 1963

roku Baird-Parker poszerzył biochemiczne kryteria klasyfikacji rodzaju *Staphylococcus* i wyróżnił sześć podgrup [5]. Niemniej gronkowiec złocisty pozostawał nadal jedynym koagulazododatnim gatunkiem [5]. Kolejne prace z lat 70. dowiodły różnic pomiędzy szczepami *S. aureus* izolowanymi od ludzi i od zwierząt [55, 72, 85]. Na ich podstawie Hájek i Maršhálek zaproponowali podział na sześć biotypów [46]. Do biotypu A zaliczyli szczepy ludzkie, do biotypu B – szczepy izolowane od drobiu i świń, do C – od krów i owiec, do D – od zajęcy, do E – od psów i koni oraz do biotypu F – od gołębi. Niedługo potem okazało się, że biotyp E i F różni się zasadniczo od *S. aureus*, pod względem cech biochemicznych oraz składu zasad DNA (G+C). Zaowocowało to wyodrębnieniem, w 1976 roku, przez Hajka nowego koagulazododatniego gronkowca, *Staphylococcus intermedius* [45]. Jego nazwa wzięła się stąd, że posiadał pośrednie właściwości pomiędzy *S. aureus*, a *S. epidermidis*. Cechą pierwszego gatunku było wytwarzanie koagulazy, a drugiego powolna fermentacja mannitolu, brak wytwarzania acetoiny oraz produkcja β -galaktozydazy. Przez długie lata *S. intermedius* pozostawał najważniejszym gronkowcem izolowanym od psów [8]. Wielu badaczy zauważało duże zróżnicowanie fenotypowe i genotypowe szczepów *S. intermedius* [8, 38, 47]. W roku 2005 Devriese na podstawie analizy sekwencji 16S rRNA i hybrydyzacji DNA-DNA wyróżnił w obrębie *S. intermedius* nowy gatunek, *Staphylococcus pseudintermedius* [28]. Dwa lata później Sasaki na podstawie analizy sekwencji genów *sodA* i *hsp60* dowiódł bliskiego pokrewieństwa trzech gatunków *S. intermedius*, *S. pseudintermedius* i *S. delphini*, które określił mianem grupy *S. intermedius* (SIG) [92]. Jak dowodzą ostatnie prace, najczęściej izolowanym gronkowcem u psów jest *S. pseudintermedius*, który de facto jest dawnym gatunkiem *S. intermedius* [41, 43, 116]. Właściwy *S. intermedius* występuje kilkakrotnie rzadziej [41, 43]. Jednak użyta w ostatniej reklasyfikacji metoda sekwencjonowania, ze względu na czaso- i kosztochłonność, nie ma zastosowania w rutynowej diagnostyce gronkowców, dlatego w wynikach badań mikrobiologicznych gatunek *S. pseudintermedius* najczęściej funkcjonuje nadal jako *S. intermedius*.

Obecnie obowiązująca klasyfikacja wyróżnia sześć koagulazododatnich gatunków gronkowców, są to: *S. aureus*, *S. intermedius*, *S. pseudintermedius*, *S. delphini*, *S. schleiferi subsp. coagulans*, *S. lutrae* oraz dwa, *S. hyicus* i *S. agentis*, spośród których nie wszystkie szczepy wytwarzają koagulazę [18]. Niemniej najważniejszym gronkowcowym patogenem człowieka pozostaje nadal *S. aureus*, a psów grupa *S. intermedius*, z najczęstszym gatunkiem *S. pseudintermedius*.

1.3. *S. aureus* fagotypu 187

Gronkowce złociste fagotypu 187 występują u ludzi sporadycznie. Stanowią zaledwie od 0,15% do 2% populacji *S. aureus* [58, 83]. Mogą być izolowane zarówno od nosicieli jak i z różnego rodzaju zmian chorobowych. Ich szczególną cechą jest zdolność zakażenia zarówno ludzi jak i psów. Mimo, że gronkowce psie typu 187 różnią się pewnymi właściwościami od szczepów ludzkich, to mogą również kolonizować ludzi. Zjawisko takie odnotowano u właścicieli psów [56].

Wrażliwość na fagi typu 187 pozostaje odmienna od pozostałych *S. aureus*. Typują się jedynie fagiem 187 i nie są wrażliwe na żadne inne fagi dla gronkowców złocistych, które nie podlegają nawet adsorpcji. Natomiast wykazują krzyżową wrażliwość z fagami dla biotypu psiego [57, 64].

W zależności od pochodzenia wykazują różnice biochemiczne. Szczepy od psów nie rozkładają mannitolu, nie wytwarzają fibrynolizyny i hemolizyny α oraz nie koagulują plazmy ludzkiej. Natomiast wytwarzają β -hemolizynę i koagulują plazmę psią, która nie jest koagulowana przez szczepy pochodzące od ludzi [56, 57]. Te właściwości, w dawnej klasyfikacji, stawiały je pomiędzy biotypem ludzkim (A) i psim (E). W oparciu o obecną klasyfikację, można je określić jako pośrednie pomiędzy gatunkiem *S. aureus*, a grupą *S. intermedius*.

Różnice antygenowe typu 187 dotyczą przede wszystkim obecności galaktozaminy zamiast glukozaminy jako determinanta w kwasie tejchojowym ściany komórkowej, dla której Oeding proponował nazwę „polisacharyd 187” [71]. Inne różnice serologiczne polegają na obecności antygenów K₁ i 17-61.218, których nie znaleziono u żadnych innych gronkowców izolowanych od ludzi [57].

Brak wrażliwości na wszystkie fagi, za wyjątkiem faga 187 oraz krzyżowa wrażliwość na fagi dla gronkowców psich, jak również odmienne od typowych *S. aureus* właściwości biochemiczne oraz antygenowe gronkowców fagotypu 187 zwróciły uwagę już w latach 70-tych, kiedy postulowano uznanie ich jako oddzielnej jednostki taksonomicznej. Od tego czasu jednak nie prowadzono badań na tej grupie gronkowców.

1.4. Nosicielstwo *S. aureus* i *S. pseudintermedius*

Przyczyny nosicielstwa gronkowców, zarówno u ludzi jak i psów, nie są jasne, a jego mechanizm jest wieloczynnikowy. Niewątpliwie jest ono wynikiem pokonywania przez gron-

kowce mechanizmów obronnych gospodarza i zasiedlania przez dłuższy czas określonej niszy w jego organizmie.

Wydzielane przez nabłonek nosa immunoglobuliny A i G, lizozym, laktoferyna i inne naturalne peptydy przeciwbakteryjne pełnią zasadniczą rolę w odporności wrodzonej [52]. Udowodniono, że u nosicieli gronkowców może mieć miejsce upośledzenie wydzielania tych substancji. Z drugiej zaś strony występuje u nich podniesione stężenie defensyn, wskazujące na obecność czynników zapalnych, którymi mogą być kolonizujące organizm gronkowce [21].

Brak zdolności peptydów przeciwbakteryjnych, wydzielanych przez nabłonek nosa, do skutecznego eliminowania gronkowców może wynikać z oporności na peptydy lub z uwarunkowań anatomicznych [22]. Gronkowce kolonizują bowiem przede wszystkim okolice przedsionka nosa, ubogiego w śluzową wydzielinę, w której znajdują się peptydy i przeciwciała [95]. Badania *in vitro* wykazały, że gronkowce są odporne na kationowe peptydy przeciwbakteryjne, poprzez mechanizm aktywnego wypompowywanie peptydów z komórki (*efflux*) oraz aktywność proteolityczną [82]. Trudno jednak rozstrzygnąć czy tego rodzaju oporność determinuje nosicielstwo gronkowców.

Uważa się też, że tkanka gruczołowa wewnętrznej ściany nosa może stanowić miejsce trwałej kolonizacji przez gronkowce. Związanie gronkowca ze śluzówką lub mucyną ma prawdopodobnie charakter przejściowy. Natomiast wiązanie gronkowców z gruczołami umożliwia ich liczne namnażanie i trwałe kolonizowanie [14].

Nosiciele są najczęściej skolonizowani przez pojedynczy szczep gronkowca. Badania na ochotnikach zakażanych mieszaniną różnych gronkowców wykazały, że u nienosicieli gronkowce były szybko eliminowane z flory, zaś u nosicieli pozostawał jedynie szczep kolonizujący ich dotychczas [70]. W związku z tym uważa się, że warunki i predyspozycje gospodarza determinują nosicielstwo określonych szczepów gronkowców, a oddziaływanie pomiędzy ich strukturami antygenowymi ma istotne znaczenie [70]. Istnieje nawet pogląd o dziedzicznych uwarunkowaniach nosicielstwa *S. aureus* u ludzi [19].

Nosicielstwo *S. aureus* u ludzi dotyczy przede wszystkim przedsionka nosa. Rzadziej obejmuje gardło, skórę oraz inne miejsca [113]. Skóra skolonizowana jest najczęściej w okolicy pachwin, pach i dłoni. Wśród zdrowych dorosłych ludzi nosicielstwo w przedsionku nosa wynosi około 30% [111]. Można wyróżnić wśród nich nosicieli stałych, u których kolonizacja gronkowcem trwa wiele miesięcy lub lat oraz grupę nosicieli przejściowych, gdzie jest ono bardziej krótkotrwałe [70, 81].

Dzieci są częściej nosicielami *S. aureus* niż dorośli. U ponad 70% noworodków uzyskuje się co najmniej jeden dodatni posiew z nosa. U niemowląt wynosi ono w zależności od wieku, od 45% w drugim miesiącu życia, do 21% w wieku 6 miesięcy [77].

Częstość nosicielstwa różni się w zależności od grup etnicznych i płci. Stwierdzono, że jest wyższe u ludzi rasy białej i u mężczyzn [22, 31]. Do osób, u których notuje się wyższy poziom nosicielstwa należą osoby z obniżoną odpornością lub chorobami podstawowymi, zakażeni HIV, chorzy na cukrzycę, z przewlekłą chorobą wątroby, pacjenci poddawani hemodializie oraz z chorobami skóry [111].

Ponadto nosicielstwo *S. aureus* może się szerzyć wśród członków rodziny na skutek zwiększonej ekspozycji. Peacock wykazał dodatnią korelację pomiędzy nosicielstwem u matek i ich dziećmi. Większość matek ma ten sam szczep co ich dzieci, co oznacza, że gronkowce przenoszą się przez bliski kontakt w rodzinie [77].

Dowodzono, że nosicielstwo *S. aureus* w przedsionku nosa jest ściśle związane z jego obecnością na rękach. Dlatego uważa się, że nosiciele głównie poprzez ręce przenoszą gronkowce do otoczenia [112]. Rozsiewane w ten sposób bakterie stanowią źródło zakażeń egzogennych, również w środowisku szpitalnym. Perl dowiódł, że aż 53% szpitalnych gronkowcowych infekcji na oddziałach chirurgii dotyczy pacjentów nie będących nosicielami *S. aureus* czyli ma charakter egzogenny [81]. Pochodzą one ze środowiska szpitalnego, gdzie istotnym źródłem zakażeń pozostają pracownicy. Jest ono wyraźnie wyższe u nich niż w reszcie populacji i może wynosić od 40 do 70% [2].

Poza człowiekiem rezerwuarem *S. aureus* mogą być również psy. U zdrowych psów, podobnie jak i u ludzi, gronkowiec złocisty jest najczęściej izolowany z nosa [41, 44, 80]. Niemniej częstość izolacji *S. aureus* od psów jest zdecydowanie niższa niż u człowieka i wynosi najwyżej 5% [41, 80]. Przypuszcza się, że do kolonizacji u psów dochodzi poprzez przeniesienie gronkowca z człowieka. Zdaniem Walther'a ma to niewątpliwy związek ze wzrostem w ostatnim czasie obustronnej transmisji mikroorganizmów pomiędzy człowiekiem i psem [110].

Nosicielstwo *S. pseudintermedius* u psów dotyczy najczęściej błon śluzowych pyska (57%) i odbytu (52%), a nie nosa (31%) jak u ludzi [8]. Częstość występowania *S. pseudintermedius* u zdrowych psów jest wyraźnie wyższa niż *S. aureus* i w zależności od badanej populacji psów wynosi 46-92% [44, 89]. Przypuszcza się że nosicielstwo może różnić się w zależności od regionu geograficznego jak i ras badanych psów [8].

Podobnie jak u ludzi, wśród psów wyróżnia się nosicielstwo stałe i czasowe. Dane dotyczące badań na ten temat są skąpe. Wydaje się jednak, że w przypadku psów nosicielstwo

stałe jest zdecydowanie wyższe niż nosicielstwo *S. aureus* u ludzi [47]. Z bieżącej literatury wynika, że więcej niż połowa, a nawet 75% psów badanych na przestrzeni jednego roku wykazywała nosicielstwo stałe [24, 47]. Podobnie jak u ludzi, częstość kolonizacji wzrasta (nawet do 87%) wraz z pojawianiem się u nich gronkowcowych chorób skóry, takich jak piodermia czy atopowe zapalenie skóry [33].

1.5. Patogenność *S. aureus* i *S. pseudintermedius*

Zakażenia wywoływane przez *S. aureus* dotyczą najczęściej mieszków włosowych oraz skóry i przebiegają z intensywnym ropnym procesem zapalnym i miejscową martwicą tkanek. Gronkowce mogą też powodować ciężkie, głębokie infekcje, w szczególności zapalenia kości i szpiku, niekiedy płuc czy wsierdzia, prowadzące do posocznicy.

S. pseudintermedius jest główną przyczyną ropnych zapaleń skóry, ucha zewnętrznego, spojówek, dróg moczowych i stawów u psów [79, 80, 86]. Może wywoływać zakażenia również u innych zwierząt, koni, kotów czy świń morskich, ale występują one rzadziej niż u psów [91]. Infekcje spowodowane przez *S. pseudintermedius* sporadycznie dotyczą ludzi. Opisano przypadki zakażeń ran po pogryzieniu przez psa oraz pojedyncze przypadki innych zakażeń, które głównie miały miejsce u właścicieli psów [54, 61, 102].

Za zjadliwość *S. aureus* i *S. pseudintermedius* odpowiedzialnych jest szereg czynników warunkujących ich zakaźność, inwazyjność i toksyczność. Należą tu struktury umożliwiające adhezję do komórek gospodarza, czynniki umożliwiające rozprzestrzenianie się oraz toksyny będące najbardziej jednoznacznym markerem chorobotwórczości gronkowców. Do typowych toksemii należą gronkowcowe złuszczone zapalenie skóry (SSSS – *staphylococcal scalded skin syndrome*), zespół wstrząsu toksycznego (TSS – *toxic shock syndrome*) czy zatrucia pokarmowe [59, 84].

Toksyny gronkowcowe o charakterze superantygenów pobudzają nieswoistą, poliklonalną proliferację limfocytów T oraz wydzielanie licznych cytokin, które zaostrzają przebieg infekcji i nasilają jej objawy, prowadząc nawet do wstrząsu toksycznego [17].

Enterotoksyny są jednymi z najwcześniej poznanych superantygenów gronkowcowych. Są one termostabilnymi białkami, wydzielanymi zewnątrzkomórkowo, które wywołują objawy zatrucia pokarmowego. Wyróżniono ponad 20 typów serologicznych enterotoksyn *S. aureus*, począwszy od czterech podstawowych SEA-SED, do opisanych ostatnio SEIU-SEIV [17]. Mimo wyróżnienia ich wielu serotypów, enterotoksyna typu A (SEA) pozostaje

odpowiedzialna za ponad 80% wszystkich przypadków zatruc gronkowcowych [84]. SEA została odkryta, jako jedna z pierwszych enterotoksyn w 1985 roku przez Betley'a i Mekalanosa [13]. Jej wytwarzanie jest warunkowane obecnością profaga [13]. Ostatnie badania dowodzą, że obecność SEA jest związana ze wstrząsem toksycznym u pacjentów z bakterią gronkowcową [35]. Dowiedziono, że rozprzestrzenie się we francuskich szpitalach gronkowców z tą toksyną przyczyniło się do 75% wzrostu przypadków wstrząsu septycznego [107]. Natomiast Peacock dostrzegł, że gronkowce wytwarzające enterotoksynę A znacznie częściej występowały wśród izolatów wywołujących zakażenia inwazyjne [78]. Przypuszcza się, że silniejsze działanie SEA w wywoływaniu odpowiedzi zapalnej niż innych superantygenów może wynikać z synergistycznego oddziaływania z komponentami ściany komórkowej oraz wywoływania kaskadowej ekspresji innych gronkowcowych egzoprotein, które sprzyjają pojawianiu się objawów wstrząsu [25].

Jedyna znana dotąd enterotoksyna typu psiego (SEC_{canine}), została scharakteryzowana przez Edwards'a w 1997 roku [30]. Wyodrębniono ją spośród patogennych *S. intermedius* izolowanych z piodermii u psów. SEC_{canine} podobnie jak inne enterotoksyny, ma zdolność pobudzenia proliferacji limfocytów T i wywoływania wymiotów. Jej sekwencja, mimo bliskiego pokrewieństwa z enterotoksynami *S. aureus* typu SEC_{1-3} , wykazuje odmienność i specyficzność gatunkową [30].

Enterotoksyna zaliczana początkowo do serotypu F, nazywana obecnie toksyną wstrząsu toksycznego (TSST-1) została scharakteryzowana w 1981 roku, niezależnie przez Schlievert'a i Bergdoll'a [12, 93]. Odpowiedzialna jest za objawy wstrząsu toksycznego, wywołanego namnażaniem bakterii we wrotach zakażenia i przenikaniem toksyny do krwi. Zdolność TSST-1 do przenikania barier śluzowych w organizmie człowieka jest prawdopodobnie przyczyną objawów ogólnoustrojowych [17]. Oba typy TSS, menstruacyjny – związany z namnażaniem *S. aureus* w tamponach i drugi – pojawiający się w przebiegu innych zakażeń gronkowcowych, warunkowane są ekspresją genu *tst*, zlokalizowanego na ruchomym elemencie chromosomu, zwanym gronkowcową wyspą patogenności (SaPI) [29]. Jak dotąd nie wykryto wytwarzania TSST-1 przez gronkowce z rezerwuarów psich.

Eksfoliatyny warunkujące liszajec zakaźny oraz gronkowcowy zespół oparzonej skóry mają charakter proteinaz serynowych, uszkodzających desmogleinę, odpowiedzialną za tworzenie mostków międzykomórkowych w warstwie ziarnistej nabłonka. Zespół dotyczy głównie noworodków i małych dzieci. Wynika to z faktu, że desmogleina występuje jedynie w skórze młodych ssaków [1]. Najlepiej poznane są dwa rodzaje toksyn eksfoliatywnych - ETA i ETB, kodowanych odpowiednio przez gen *eta*, zlokalizowany na chromosomie i gen

etb, zlokalizowany na plazmidzie. Oba typy mimo różnic serologicznych mają zbliżoną aktywność biologiczną [59].

Poznana stosunkowo niedawno toksyna eksfoliatywna *S. pseudintermedius* (SIET), została opisana przez Terauchiego, w 2003 roku [104]. Wykazał on epidermolityczne działanie SIET po podskórnej iniekcji jednodniowym noworodkom chomików i psów. Podanie SIET dorosłym psom wywołuje zaczerwienienia i złuszczenie naskórka, dlatego przypisuje się jej rolę w patogenezie psiej piodermii oraz zapaleniu ucha [60].

Leukocydyna Panton –Valentine (PVL) należy do grupy dwuskładnikowych leukotoksyn *S. aureus*, złożonych z dwóch podjednostek klasy F i S, kodowanych odpowiednio przez dwa geny *lukS-PV* i *lukF-PV*. Aktywność PVL jest uwarunkowana jednoczesnym działaniem obu białek. Wykazuje cytotoksyczność w stosunku do ludzkich i króliczych neutrofilów, makrofagów oraz aktywność nekrotyczną, po podaniu śródskórnym [63].

S. pseudintermedius wytwarza leukotoksynę o podobnych właściwościach do PVL, nazywaną Luk-I [87]. Składa się ona z dwóch komponentów, LukS i LukF i wykazuje silne działanie leukotoksyczne i nieznaczne właściwości hemolityczne w stosunku do krwinek królika [39]. Jej obecność może mieć związek z epidemicznymi klonami *S. pseudintermedius* [91].

Wytwarzanie toksyn przez gronkowce jest regulowane przez systemy kontroli ekspresji. Największe znaczenie odgrywa system globalnej regulacji – *agr* (*accessory gene regulator*). Locus *agr* składa się z pięciu genów *agrA*, *agrB*, *agrC*, *agrD* i *hld* oraz zawiera dwie jednostki transkrypcyjne RNAII i RNAIII, znajdujące się pod kontrolą promotorów P2 i P3. Operon kontrolowany przez P2 składa się z czterech genów (*agrA-agrD*), których ekspresja jest niezbędna do autokatalitycznej aktywacji P2 oraz operonu kontrolowanego przez P3. Aktywacja promotora P3 uruchamia transkrypcję RNAIII, który jest cząstką efektorową systemu *agr* i reguluje ekspresję genów ponad 130 białek *S. aureus*. Pod kontrolą systemu *agr* pozostają geny najważniejszych toksyn gronkowcowych, takich jak enterotoksyny, toksyna wstrząsu toksycznego, eksfoliatyny A i B, leukocydyna PV, hemolizyny (α , β , γ , δ) oraz białko A [16].

Polimorfizm w regionach zmiennych genów *agrC* i *agrD* umożliwia wyróżnienie czterech grup specyficzności *agr* (I-IV). Przynależność *S. aureus* do danej grupy jest skorelowana z jego pochodzeniem i wirulencją. Wykazano, że szczepy izolowane ze złuszczonego zapalenia skóry (SSS), wytwarzające eksfoliatyny należą najczęściej do grupy IV, a szczepy izolowane z zespołu wstrząsu toksycznego do grupy III [3, 50, 69].

2. CELE PRACY

Prezentowany cykl prac miał na celu zbadanie wybranych czynników patogenności wśród koagulazododatnich gronkowców, pochodzących ze zmian chorobowych oraz z przypadków nosicielstwa. Nie ograniczając się jedynie do gronkowców izolowanych od ludzi badaniami objęto również populację koagulazododatnich gronkowców pochodzących od psów, a także gronkowce złociste fagotypu 187, mogące zakażać zarówno ludzi jak i psy.

Szczegółowe cele obejmowały:

1. Porównanie występowania wybranych markerów chorobotwórczości wśród szczepów *S. aureus* pochodzących ze zmian chorobowych i od nosicieli u ludzi
 - a/ w oparciu o występowanie genów toksyn
 - b/ w oparciu o polimorfizm w systemie regulacji ekspresji genów toksyn - *agr*
2. Porównanie występowania wybranych markerów chorobotwórczości wśród szczepów *S. pseudintermedius* pochodzących ze zmian chorobowych i od nosicieli u psów.
3. Zbadanie występowania genów toksyn w grupie gronkowców złocistych fagotypu 187 pochodzących ze zmian chorobowych i od nosicieli u ludzi.
4. Porównanie gronkowców złocistych fagotypu 187 z gronkowcami izolowanymi od ludzi i od psów w oparciu o polimorfizm fragmentów restrykcyjnych genu acetylotransferazy fosforanowej (*pta*).

3. MATERIAŁ I METODY

3.1. Pozyskiwanie szczepów gronkowców

Ogółem badaniami objęto 865 szczepów koagulazododatnich gronkowców, w tym 640 szczepów pochodzących od ludzi i 225 szczepów wyizolowanych od psów. Gronkowce złoci-
ste fagotypu 187 wyodrębniono spośród 1073 szczepów *S. aureus* poddawanych typowaniu w
Ośrodku Typowania Fagowego Zakładu Mikrobiologii Lekarskiej GUMed.

W grupie *S. aureus* izolowanych od ludzi znalazły się: szczepy pochodzące ze zmian
chorobowych pacjentów ze szpitali, szczepy wyizolowane od pacjentów z nawrotową czy-
racznością oraz szczepy pochodzące od zdrowych nosicieli. Pierwsza grupa szczepów pocho-
dziła z 25 szpitali na terenie Polski (Gdańsk, Gdynia, Człuchów, Kartuzy, Kościerzyna,
Kraków, Lębork, Siemianowice, Słupsk, Starogard Gdański, Tczew i Wejherowo).

W grupie gronkowców izolowanych od psów zdrowych i chorych badano: 204 szczepy
S. pseudintermedius, 17 szczepów *S. aureus* i 4 szczepy *S. intermedius*. Szczepy wyizolowa-
no w gabinetach i przychodniach weterynaryjnych w Gdańsku, Pruszczu Gdańskim, Lęborku
i Gdyni.

3.2. Szczepy wzorcowe

Przy wykrywaniu genów toksyn metodą PCR, jako dodatnich kontroli użyto: *S. aureus*
14.003 (*eta+*, *etb+*), *S. aureus* 14.004 (*sea+*, *tst+*) z kolekcji Narodowego Instytutu Zdrowia
Publicznego w Warszawie (Mikrobank) oraz szczepów *S. aureus* 490/02 (*sec+*, *sed+*), *S. au-*
reus 864/04 (*seb+*), *S. aureus* 179/04 (*lukS-PV/F-PV+*) z kolekcji Zakładu Mikrobiologii
Lekarskiej GUMed.

Do oznaczanie produkcji białka A służył szczep *S. aureus* Cowan I (kontrola dodatnia)
i *S. aureus* Wood 46 (kontrola ujemna) z Uniwersytetu w Bergen. Przy oznaczaniu wytwa-
rzania fibrylizyny kontrolę dodatnią stanowił *S. aureus* Wood 46, a przy oznaczaniu feno-
typowym innych czynników – *S. aureus* ATCC 25923.

W identyfikacji gronkowców izolowanych od psów kontrolę dodatnią stanowiły szczepy
S. intermedius PCM2405 (Polish Collection of Microorganisms) oraz *S. aureus* ATCC 6538P.

3.3. Identyfikacja biochemiczna

Bakterie wyrosłe w postaci okrągłych, wypukłych i błyszczących kolonii, o średnicy 1 – 3 mm, o barwie kremowej lub żółtej, barwiące się Gram-dodatnio wstępnie rozpoznawano jako gronkowce.

Identyfikację biochemiczną gronkowców prowadzono przy użyciu komercyjnego testu API ID32 Staph (BioMerieux, Francja) zgodnie z instrukcją dołączoną do testu. W tym celu przygotowywano zawiesinę badanych gronkowców o gęstości optycznej 0,5 w skali Mc Farlanda (2×10^8 CFU/ml) i nanoszono do poszczególnych studzienek na pasku. Zbadano w ten sposób wytwarzanie: ureazy (URE), dihydrolazy argininy (ADH), 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), celobiozy (CEL), redukcję azotanów (NIT), wytwarzanie acetoiny (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 h inkubacji w temperaturze 37 °C na czytniku elektronicznym ATB Expression, Vitek Systems (BioMerieux, Francja) sprzężonym z komputerem i obsługiwanym przez program ATB PLUS.

3.4. Identyfikacja genetyczna

3.4.1. Wykrywanie genu termostabilnej nukleazy *nucSA*

3.4.1.1. Izolowanie DNA

Bakteryjne DNA pozyskiwano stosując zestaw Easy Genomic DNA Preparation (A&A Biotechnology, Polska). 1 ml 18-godzinnej hodowli gronkowców w podłożu TSB (Difco, USA) wirowano (12000 obr./min) przez 5 min, osad zawieszano w 200 μ l roztworu 2% Triton X-100 w 2 M NaCl (Serva, Niemcy). Do zawiesiny dodawano 2,5 μ l lizostafiny (Sigma, USA) do uzyskania końcowego stężenia 25 μ g/ml i inkubowano w 37 °C przez 30 min. Następnie dodawano 1 μ l proteinazy K (20 mg/ml; Sigma, USA), podwyższając jednocześnie

temperaturę inkubacji do 65 °C. Po 15 min zawiesinę chłodzono do temperatury pokojowej, dodawano 400 µl chloroformzolu (A&A Biotechnology, Polska), całość mieszano przez 10 s, następnie odwirowywano (8000 obr./min) przez 5 min. Górną fazę odpipetowywano, zawarty w niej DNA wytrącano z użyciem 300 µl alkoholu izopropylowego (Serva, Niemcy). Próbę pozostawiano przez 18 h w temperaturze -20 °C. Po odwirowaniu, osad przemywano 70% alkoholem etylowym i suszono w temperaturze pokojowej. DNA rozpuszczano w 100 µl buforu TE (10 mM Tris pH=8; 1 mM EDTA; Sigma, USA), jego stężenie określano spektrofotometrycznie (Kalkulator DNA, Pharmacia). DNA przechowywano w temperaturze -20 °C, a do reakcji PCR używano DNA o stężeniu 5 ng/µl.

3.4.1.2. Reakcja PCR

Mieszanina reakcyjna zawierała po 10 pmol starterów *nucSA1* i *nucSA2* [9] 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 dezoksyrybonukleozydów (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 do całkowitej objętości 50 µl. Amplifikację prowadzono w automatycznym termocyklerze GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer, USA) poprzez wstępną denaturację w 95 °C przez 4 min, dalej w 30 cyklach obejmujących denaturację w 95 °C przez 30 s, przyłączanie starterów w 55 °C przez 30 s i wydłużanie łańcucha w 72 °C przez 30 s.

3.4.1.3. Elektroforeza produktu PCR

Produkt amplifikacji nanoszono do studzienek w 1,5% żelu agarozowym (Sigma, USA) z bromkiem etydydy (ICN Biomedicals Inc., Austria). Mieszano 10 µl produktu PCR z 2 µl buforu obciążającego (60% glicerol, 0,09% błękit bromofenolowy, 0,09% ksylen, 60 mM EDTA; MBI Fermentas, Litwa). Żel zanurzano w buforze TAE (0,04 M Tris-octan, 0,001 M EDTA; Sigma, USA) i prowadzono rozdział elektroforetyczny przy natężeniu 45 mA z wykorzystaniem zasilacza STABNAP 300 (Kucharczyk TE, Polska). Następnie żel fotografowano

na transiluminatorze UV (Sigma, USA). Wielkość zamplifikowanego fragmentu porównywano z pozycją markerów ciężaru cząsteczkowego (GeneRuler 50 bp DNA Ladder, MBI Fermentas, Litwa).

3.4.2. Identyfikacja *S. pseudintermedius* metodą polimorfizmu fragmentów restrykcyjnych (PCR-RFLP) genu *pta*

DNA izolowano przy użyciu zestawu do izolacji bakterii Gram-dodatnich zgodnie z instrukcją dołączoną do zestawu (Sigma-Aldrich, Polska). Mieszanina reakcyjna jak w punkcie 3.4.1.1 zawierała po 10 pmol starterów *pta1* i *pta2* [7]. Amplifikację prowadzono w automatycznym termocyklerze GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer, USA) poprzez wstępną denaturację w 95 °C przez 2 min, dalej w 30 cyklach obejmujących: denaturację w 95 °C przez 1 min, przyłączanie starterów w 53 °C przez 1 min, wydłużanie łańcucha w 72 °C przez 1 min, w ostatnim cyklu przeprowadzono dodatkowo całkowitą polimeryzację w 72 °C przez 7 min. Produkt amplifikacji o objętości 20µl inkubowano przez 18 h z 5U enzymu *MboI* i 5µl buforu. Fragmenty restrykcyjne wykrywano w 2% żelu agarozowym zgodnie z metodyką opisaną w punkcie 3.4.1.3.

3.5. Czynniki patogenności wykrywane fenotypowo

3.5.1. Wykrywanie czynnika zlepnego (CF)

Na szkiełku podstawowym w kropli soli fizjologicznej przygotowywano bardzo gęstą zawiesinę 24-godzinnej hodowli gronkowców. Do niej dodawano dużą kroplę osocza króliczego (Biomed, Kraków), całość mieszano lekko kołysząc szkiełkiem. Pojawienie się w ciągu 5 – 30 sekund zlepow komórek odczytywano jako wynik dodatni. Pozostanie jednorodnej zawiesiny odczytywano jako wynik ujemny [51]. Szczepu *S. aureus* ATCC 25923 użyto jako kontroli dodatniej.

3.5.2. Koagulowanie osocza ludzkiego, króliczego i psiego

Do badania używano 24-godzinnej hodowli szczepu prowadzonej w 37 °C na płynnym podłożu TSB (Difco, USA). W probówce o średnicy 10 mm zawierającej 0,8 ml hodowli bakteryjnej dodano 0,2 ml osocza (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 odczytywano jako wynik dodatni [98]. Szczepu *S. aureus* ATCC 25923 użyto jako kontroli dodatniej.

3.5.3. Wykrywanie termostabilnej DNazy

Hodowle 18-godzinne badanych szczepów na podłożu BHI ogrzewano przez 15 min w 100 °C. Schłodzone hodowle nanoszono do studzienek wyciętych w podłożu DNase (Becton-Dickonson, USA) i inkubowano w 37 °C przez 24 h. Następnie do studzienek dodawano 0,1% roztworu błękitu toluidyny i inkubowano w temperaturze pokojowej. Pojawienie się różowego zabarwienia wokół studzienki odczytywano jako wynik dodatni, niebieskiego zabarwienia – jako wynik ujemny [109]. Szczepu *S. aureus* ATCC 25923 użyto jako kontroli dodatniej.

3.5.4. Oznaczanie wytwarzania hemolizyny β

Wytwarzanie hemolizyny β prowadzono na podłożu Columbia agar (Oxoid, UK) z dodatkiem 5% krwi baraniej (Graso, Polska). Badane szczepy wysiewano w postaci podłużnego rozmazu i inkubowano w atmosferze tlenowej przez 24 h w 37 °C. Pojawienie się szerokiej, ostro oddzielonej strefy odbarwienia podłoża, która w temperaturze 4 °C, przez następne 18 h inkubacji, przechodziła w całkowite przejaśnienie, odczytywano jako wynik dodatni [26]. Szczepu *S. aureus* ATCC 25923 użyto jako kontroli dodatniej.

3.5.5. Wykrywanie fibrylizyny

Bydłęcy fibrynogen (Sigma, USA) rozpuszczano w 2-krotnie stężonym, jałowym bulionie odżywczym (Nutrient Broth no.2; Oxoid, UK) do końcowego stężenia 0,2%, i dodawano do 3% rozpuszczonego agaru o takiej samej objętości. W celu precypitacji fibryny mieszaninę ogrzewano w temperaturze 55 °C w łaźni wodnej przez 10 min. Następnie do mieszaniny dodawano surowicę psią (Sigma, USA) do końcowego stężenia 0,5%. Podłoże kontrolne nie zawierało surowicy. Badane szczepy wysiewano w postaci podłużnego rozmazu na podłoże testowe i kontrolne. Wynik odczytywano po 24 h oraz 48 h inkubacji w atmosferze tlenowej, w temperaturze 37 °C. Występowanie strefy przejaśnienia wokół wzrostu bakterii na podłożu testowym i brak takiej strefy na podłożu kontrolnym odczytywano jako wynik dodatni [27]. Szczepu *S. aureus* Wood 46 użyto jako kontroli dodatniej.

3.5.6. Oznaczanie wytwarzania białka A

Hodowlę badanego szczepu (TSB, 37 °C, 18 h w łaźni wodnej z wytrząsaniem) o objętość 10 µl nanoszono na nitrocelulozę (Schleicher & Schuell, Niemcy) i suszono w temperaturze pokojowej przez 60 min. W celu zablokowania miejsc niespecyficznie wiążących przeciwciała, płukano ją w 3% BSA (Serva, Niemcy) przez 60 min w temperaturze pokojowej, używając mieszkadła uchylnego. Następnie nitrocelulozę płukano w buforze TBS (10 mM Tris, pH=7,4; Serva, Niemcy) trzy razy po 15 min, po czym zanurzano na 60 min w roztworze przeciwciał króliczych (1/1.000 w TBS), znakowanych peroksydazą (DAKO, Dania). Po wypłukaniu nitrocelulozy, 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 min 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 niebieskie zabarwienie, a brak zabarwienia w miejscu naniesienia próby odczytywano jako wynik ujemny [53]. Szczepu *S. aureus* Cowan I użyto jako kontroli dodatniej.

3.5.7. Oznaczanie właściwości lipolitycznych

Właściwości lipolityczne oznaczano na podłożu TSA (Difco, USA) z dodatkiem 1% Tween 80 i 0,1% CaCl₂ (Serva, Niemcy). Badane szczepy wysiewano w postaci podłużnego rozmazu. Inkubację prowadzono w warunkach tlenowych, przez 24 h w temperaturze 37 °C. Pojawienie się wyraźnej strefy zmętnienia wokół wzrostu bakterii odczytywano jako wynik dodatni [96]. Szczepu *S. aureus* ATCC 25923 użyto jako kontroli dodatniej.

3.5.8. Badanie wytwarzania biofilmu

Całonocną hodowlę bulionową badanego szczepu o objętość 3 ml (TSB, 37 °C, 18 h) rozcieńczano 1:1000 w podłożu TSB. Rozcieńczoną hodowlę o objętości 200 µl przenoszono do 96-dołkowej płytki mikrotitracyjnej (Becton-Dickinson, USA). Badanie każdego szczepu wykonano w trzykrotnym powtórzeniu. Kontrolę ujemną stanowiło samo podłoże TSB. Płytki inkubowano 24 h w 37 °C. Następnie płukano je dwukrotnie buforem PBS (0,14 M NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄, pH 7,2) i suszono odwrócone w temperaturze pokojowej. Dalej w celu przyklejenia biofilmu suszono płytki przez godzinę w 60 °C. Dodawano do każdego dołka po 200 µl 1% fioletu krystalicznego Hucker'a i barwiono przez 15 min. Barwnik usuwano pipetą, a płytkę płukano dwukrotnie pod bieżącą wodą. Następnie suszono i dodawano po 150 µl 95% etanolu do każdego dołka. Absorbancję mierzono spektrofotometrycznie na czytniku Asys Hitech Expert Plus (Biochrom, Wielka Brytania) przy długości fal 570 nm (OD₅₇₀). Dokonywano odczytu dla każdego powtórzenia badanego szczepu i wyciągano średnią. Cutoff OD (OD_c) było określone jako trzy standardowe odchylenia powyżej średniej OD kontroli ujemnej. Badane szczepy podzielono na cztery kategorie: nie wytwarzające biofilmu (OD ≤ OD_c), słabo wytwarzające biofilm (OD_c < OD ≤ 2 × OD_c), średnio wytwarzające biofilm (2 × OD_c < OD ≤ 4 × OD_c) i silnie wytwarzające biofilm (4 × OD_c < OD) [99].

3.6. Wykrywanie genów toksyn metodą PCR

3.6.1. Wykrywanie genów enterotoksyn *S. aureus*

DNA izolowano zgodnie z opisem w punkcie 3.4.1.1. Mieszanina reakcyjna przygotowana jak w punkcie 3.4.1.2 zawierała po 20 pmol starterów dla genów *sea*, *seb* i *sec* oraz 40 pmol starterów dla genu *sed* [68]. Amplifikację prowadzono w automatycznym termocyklerze GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer, USA) poprzez wstępną denaturację w 95 °C przez 2 min, dalej w 30 cyklach obejmujących: denaturację w 95 °C przez 1 min, przyłączenie starterów w 53 °C przez 1 min, wydłużanie łańcucha w 72 °C przez 1 min, w ostatnim cyklu przeprowadzono dodatkowo całkowitą polimeryzację w 72 °C przez 7 min. Produkty amplifikacji wykrywano w 2% żelu agarozowym zgodnie z metodyką opisaną w punkcie 3.4.1.3.

3.6.2. Wykrywanie genów eksfoliatyn i toksyny wstrząsu toksycznego *S. aureus*

DNA izolowano zgodnie z opisem w punkcie 3.4.1.1. Mieszanina reakcyjna przygotowana jak w punkcie 3.4.1.2 zawierała startery dla genów *eta* (50 pmol), *etb* (20 pmol) oraz *tst* (20 pmol) [68]. Amplifikację przeprowadzono w automatycznym termocyklerze GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer, USA) poprzez wstępną denaturację w 94 °C przez 5 min, dalej w 35 cyklach obejmujących: denaturację w 94 °C przez 2 min, przyłączenie starterów w 57 °C przez 2 min, wydłużanie łańcucha w 72 °C przez 1 min (przedłużając o dodatkowe 6 minut w ostatnim cyklu). Produkty amplifikacji wykrywano w 2% żelu agarozowym zgodnie z metodyką opisaną w punkcie 3.4.1.3.

3.6.3. Wykrywanie genów leukocydyny PV *S. aureus*

DNA izolowano zgodnie z opisem w punkcie 3.4.1.1. Mieszanina reakcyjna przygotowana jak w punkcie 3.4.1.2 zawierała startery dla genów *lukS-PV* (20 pmol) i *lukF-PV*

(20 pmol) [63]. Amplifikację prowadzono w automatycznym termocyklerze GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer, USA) w 30 cyklach obejmujących: denaturację w 94 °C przez 30 s, przyłączanie starterów w 55 °C przez 30 s, wydłużanie łańcucha w 72 °C przez 1 min. Produkty amplifikacji wykrywano w 4% żelu agarozowym zgodnie z metodyką opisaną w punkcie 3.4.1.3.

3.6.4. Wykrywanie genów enterotoksyn i toksyny wstrząsu toksycznego wśród szczepów *S. pseudintermedius*

DNA izolowano zgodnie z opisem w punkcie 3.4.1.1. Mieszanina reakcyjna przygotowana jak w punkcie 3.4.1.2 zawierała startery dla genów: *sea* (20 pmol), *seb* (10 pmol), *sec* (20 pmol), *sed* (20 pmol), *see* (20 pmol) oraz *tst* (20 pmol) [11]. Amplifikację przeprowadzono w automatycznym termocyklerze GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer, USA) poprzez wstępną denaturację w 95 °C przez 2 min, w 30 cyklach obejmujących: denaturację w 95 °C przez 1 min, przyłączanie starterów w 55 °C przez 1 min, wydłużanie łańcucha w 72 °C przez 2 min (przedłużając o dodatkowe 5 min w ostatnim cyklu). Produkty amplifikacji wykrywano w 3% żelu agarozowym zgodnie z metodyką opisaną w punkcie 3.4.1.3.

3.6.5. Wykrywanie genu eksfoliatyny *S. pseudintermedius*

DNA izolowano zgodnie z opisem w punkcie 3.4.1.1. Mieszanina reakcyjna zawierała startery *siet1* i *siet2* zgodnie z opisem Lautz'a [60]. Amplifikację prowadzono w automatycznym termocyklerze GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer, USA) poprzez wstępną denaturację w 94 °C przez 3 min, dalej w 30 cyklach obejmujących: denaturację w 94 °C przez 30 s, przyłączanie starterów w 56 °C przez 1 min, wydłużanie łańcucha w 72 °C przez 1 min, w ostatnim cyklu przeprowadzono dodatkowo całkowitą polimeryzację w 72 °C przez 5 min. Produkty amplifikacji wykrywano w 2% żelu agarozowym zgodnie z metodyką opisaną w punkcie 3.4.1.3.

3.6.6. Wykrywanie genów leukotoksyny *S. pseudintermedius*

DNA izolowano zgodnie z opisem w punkcie 3.4.1.1. Mieszanina reakcyjna przygotowana jak w punkcie 3.4.1.2. zawierała startery dla genów *lukS* i *lukF* zgodnie z opisem Futagawa-Saito [39]. Amplifikację przeprowadzono w automatycznym termocyklerze GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer, USA) w 35 cyklach obejmujących: denaturację w 94 °C przez 1 min, przyłączanie starterów w 57 °C przez 1 min, wydłużanie łańcucha w 72 °C przez 1 min. Produkty amplifikacji wykrywano w 2% żelu agarozowym zgodnie z metodyką opisaną w punkcie 3.4.1.3.

3.7. Wykrywanie grup *agr* wśród szczepów *S. aureus*

DNA izolowano zgodnie z opisem w punkcie 3.4.1.1. Mieszanina reakcyjna przygotowana jak w punkcie 3.4.1.2 zawierała startery reakcji *pan-agr*, *agr I*, *agr II*, *agr III* i *agr IV* zgodnie z opisem Shopsin [94]. Amplifikację przeprowadzono w automatycznym termocyklerze GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer, USA) zgodnie ze schematem: 94 °C przez 5 min dalej w 25 cyklach obejmujących denaturację w 94 °C przez 1 min, przyłączanie starterów w 55 °C przez 1 min, wydłużanie łańcucha w 72 °C przez 1 min. Produkty amplifikacji wykrywano w 2% żelu agarozowym zgodnie z metodyką opisaną w punkcie 3.4.1.3.

3.8. Sekwencjonowanie genu *sec*

Amplifikowany fragment *sec* zgodnie z opisem w punkcie 3.6.4 wielkości 271 pz został poddany analizie sekwencyjnej DNA w automatycznym sekwencjonerze DNA ABI 377 (Applied Biosystems, Foster City, California) zgodnie z opisem Becker'a [10]. Otrzymane sekwencje porównano do sekwencji referencyjnych: *sec*_{canine} U91526; *sec*₁ X05815; *sec*₂ DQ192646; *sec*₃ X51661.

3.9. Różnicowanie szczepów *S. aureus* metodą polimorfizmu fragmentów restrykcyjnych (PCR/RFLP) genu *coa*

DNA izolowano zgodnie z opisem w punkcie 3.4.1.1. Mieszanina reakcyjna przygotowana jak w punkcie 3.4.1.2 zawierała po 10 pmol starterów COAG2 i COAG3 [42]. Amplifikację prowadzono w automatycznym termocyklerze GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer, USA) poprzez wstępną denaturację w 95 °C przez 4 min, dalej w 25 cyklach obejmujących: denaturację w 95 °C przez 1 min, przyłączanie starterów w 60 °C przez 1 min, wydłużanie łańcucha w 72 °C przez 1 min, w ostatnim cyklu przeprowadzono dodatkowo całkowitą polimeryzację w 72 °C przez 3 min. Produkt amplifikacji o objętości 10 µl inkubowano przez 3 h z 5U enzymu *AhaI* i 5 µl buforu. Fragmenty restrykcyjne wykrywano w 4% żelu agarozowym zgodnie z metodyką opisaną w punkcie 3.4.1.3.

3.10. Różnicowanie szczepów *S. aureus* metodą polimorfizmu fragmentów restrykcyjnych (PCR/RFLP) genu *spa*

DNA izolowano zgodnie z opisem w punkcie 3.4.1.1. Mieszanina reakcyjna przygotowana jak w punkcie 3.4.1.2 zawierała po 10 pmol starterów *spa1* i *spa2* [36]. Amplifikację prowadzono w automatycznym termocyklerze GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer, USA) poprzez wstępną denaturację w 95 °C przez 4 min, dalej w 25 cyklach obejmujących: denaturację w 95 °C przez 1 min, przyłączanie starterów w 60 °C przez 1 min, wydłużanie łańcucha w 72 °C przez 1 min, w ostatnim cyklu przeprowadzono dodatkowo całkowitą polimeryzację w 72 °C przez 3 min. Produkt amplifikacji o objętości 10 µl inkubowano przez 3 h z 10 U enzymu *HinfI* i 5 µl buforu. Fragmenty restrykcyjne wykrywano w 2,5% żelu agarozowym zgodnie z metodyką opisaną w punkcie 3.4.1.3.

3.11. Różnicowanie szczepów *S. aureus* metodą elektroforezy pulsacyjnej w zmiennym polu elektrycznym (PFGE)

DNA bakteryjny o wysokiej masie cząsteczkowej uzyskiwano z bloczków agarowych po ich inkubacji w roztworach enzymów hydrolizujących składniki komórki bakterii według Chung [20]. Pojedynczą kolonię badanego szczepu przesiewano 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 sporządzano zawiesinę o gęstości 3,5 w skali Mc Farlanda w fizjologicznym roztworze soli. Zawiesinę o objętości 1,5 ml wirowano (8.000 obr./min), osad bakteryjny zawieszono w 150 µl buforu PIV (0,01 M Tris pH=8,0; 1 M NaCl). Następnie dodawano 150 µl ogrzanej do temperatury 50 °C płynnej agarozy SeaPlaque (FMC, USA) o stężeniu 2%, i dokładnie mieszano. Mieszaninę w ilości 20 µl наносono na płytkę szklaną powleczoną warstwą parafilmu (Sigma, USA). Krople przykrywano odtłuszczonymi, mikroskopowymi szkiełkami podstawowymi na wysokości około 3 mm od parafilmu, tak by przybrały kształt krążka. Krążki pozostawiono przez 5 minut w temperaturze -20 °C, następnie przenoszono do probówek typu Eppendorf (Saerstedt, Niemcy) i dodawano świeżo przygotowany roztwór EC (6 mM Tris pH=8,0; 1 M NaCl; 0,1 M EDTA; 0,2% deoksyholan 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. RNAzę i lizozym dodawano do buforu tuż przed użyciem. Roztwór EC usuwano, krążki agarowe zalewano 1 ml buforu ESP (0,5 M EDTA pH=9; 1% sarkozyl; 1 mg/ml proteinaza K) (Boehringer-Manheim, Niemcy). Krążki inkubowano w 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 czterokrotnie. Krążki przenoszono do nowych probówek typu Eppendorf, dodawano 1 ml roztworu TE i przechowywano w temperaturze 4 °C.

3.11.1. Trawienie enzymem restrykcyjnym i rozdział elektroforetyczny

Krążek zawierający wysokocząsteczkowy DNA przeniesiono do probówki Eppendorfa, zalano 100 µl buforu Yellow Tango® (MBI Fermentas, Litwa) i inkubowano w temperaturze

pokojoyej przez 15 min. Następnie bufor odpipetowano, a krążek zalano 50 µl buforu Yellow Tango® zawierającego 20 U enzymu *SmaI* (MBI Fermentas, Litwa). Przeprowadzono trwającą 3,5 h inkubację w temperaturze pokojowej. Mieszaninę odpipetowano, a krążek zalano 250 µl roztworu TE (Sigma, USA). Następnie próbki chromosomalnego DNA poddawano 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.

3.11.2. 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. W analizie zastosowano współczynnik podobieństwa Dice'a oraz metodę grupowania UPGMA [100].

Typy PFGE definiowano według kryteriów przyjętych przez Tenovera [103].

3.12. Typowanie fagowe

Typowanie fagowe prowadzono według metodyki Blaira i Williamsa [15] z zastosowaniem podstawowego zestawu 23 fagów, ujętych w pięciu grupach litycznych:

- 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)

oraz 3 fagów dodatkowych: 88, 89, 187. Namnażanie fagów przeprowadzono na szczepach homologicznych *S. aureus* (Colindale, Anglia) w bulionie fagowym (2,5% pepton, 0,2% glu-

koza, 0,3% wyciąg wołowy, 0,5% NaCl pH=7,4, Difco) przez 6 h w 37 °C. Miano faga określano przez 10-krotne rozcieńczenie jałową solą fizjologiczną lizatu faga i nanoszenie na agar fagowy (1% pepton, 0,1% glukoza, 0,3% wyciąg drożdżowy, 1,3% agar, 400 mg/ml CaCl₂, pH=7,4 Difco) pokryty szczepem homologicznym. Typowanie prowadzono wysiewając badany szczep na agarze fagowym i nanosząc zawiesiny kolejnych bakteriofagów. Podłoża inkubowano w 37 °C przez 18 h. Zlewną lizę badanego szczepu przy danym fagu określano jako reakcję dodatnią. Wzór fagowy szczepu tworzyły numery fagów dające silną reakcję.

3.13. Obliczenia statystyczne

Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu programu Statistica 10 (StatSoft®). Do oceny różnic w występowaniu czynników chorobotwórczości, genów toksyn i grup *agr* zastosowano test Pearsona chi kwadrat oraz test Fishera, przyjmując wartość $p \leq 0,05$ jako statystycznie znamienne.

4. OMÓWIENIE WYNIKÓW

4.1. Ocena występowania wybranych genów toksyn oraz zróżnicowania w systemie regulacji ekspresji (*agr*) wśród szczepów *S. aureus* pochodzących ze zmian chorobowych i od nosicieli u ludzi [Praca 3, 4, 5, 7]

Pierwszy etap badań miał na celu określenie występowania genów toksyn o charakterze superantygenów wśród 210 szczepów *S. aureus* wyizolowanych z różnych zmian chorobowych od pacjentów szpitalnych. Głównie były to materiały pochodzące z ran i układu oddechowego. Badania obejmowały zarówno szczepy wrażliwe i odporne na metycylinę [Praca 7]. Wykrywano geny czterech podstawowych enterotoksyn (*sea-sed*) i toksyny wstrząsu toksycznego (*tst*) metodą multiplex PCR. Wykazano, że prawie połowa badanych szczepów (48%) miała gen enterotoksyny A (*sea*), podczas gdy geny *tst* (15,2%), *seb* (5,2%), *sec* (7,1%) i *sed* (0,5%) występowały zdecydowanie rzadziej. Wyniki te dowodzą, że enterotoksyna A (SEA) jest najczęściej występującym superantygenem wśród gronkowców izolowanych ze zmian chorobowych.

W celu porównania występowania genów toksyn w grupie gronkowców złocistych izolowanych od nosicieli z przedślonka nosa przebadano 321 studentów kierunków medycznych, odbywających zajęcia w Zakładzie Mikrobiologii Lekarskiej [Praca 4]. Okazało się, że 67 (20,9%) osób było nosicielami *S. aureus*. Wyizolowane szczepy *S. aureus* przebadano na obecność genów enterotoksyn (*sea-sed*), toksyny wstrząsu toksycznego (*tst*), eksfoliatyn (*eta* i *etb*) oraz leukocydyny PV (*lukS/F-PV*). Badanie wykazało występowanie u 40,3% szczepów przynajmniej jednego genu toksyny. Najbardziej rozpowszechnione okazały się geny toksyny wstrząsu toksycznego (*tst*) i enterotoksyny C (*sec*), stanowiące odpowiednio 15% i 13,4%. Porównując uzyskane wyniki z grupą szczepów pochodzących ze zmian chorobowych wynika, że odsetki *tst* i *seb-sed* były zbliżone i różniły się nieznacznie. Wyraźna różnica dotyczy enterotoksyny A, której geny wykryto jedynie u 6% szczepów od nosicieli w porównaniu do 48% szczepów ze zmian chorobowych. W świetle prezentowanych wyników i bieżącego piśmiennictwa wydaje się, że patogenne działanie SEA dotyczy nie tylko gronkowców będących przyczyną zatruc pokarmowych, ale również szczepów *S. aureus* izolowanych ze zmian chorobowych u ludzi [35, 78].

Badanie zróżnicowania szczepów od nosicieli w zależności od obecnych genów toksyn metodą makrorestrykcyjnej analizy DNA z użyciem elektroforezy w zmiennym polu elek-

trycznym (PFGE) wykazało dużą heterogenność szczepów. Wyróżniono aż 11 typów (A-L) i 37 podtypów PFGE. Typy B-D były najliczniejsze i obejmowały ponad połowę badanych gronkowców. Klony B, C, D, G, L i K charakteryzowała obecność genów toksyn. W oparciu o makrorestrykcyjną analizę dowiedziono, że wśród szczepów od nosicieli występuje duże zróżnicowanie klonów niosących geny toksyn. Mimo, że wykryte geny stanowią o potencjale patogennym gronkowców, to są one rozproszone w badanej populacji i nie związane z jednym epidemicznym klonem.

W kolejnym etapie badań poddano analizie gronkowce złociste pochodzące od chorych cierpiących na nawrotową czyraczność [**Praca 3**]. Wywołują one głębokie, ropne infekcje mieszków włosowych, z tendencją do nawrotów. Mimo, że wystąpieniu choroby ze strony gospodarza sprzyja uszkodzenie skóry na skutek otarcia, ucisku czy nadmiernej potliwości to jednak częściej czyraki powstają na zdrowej skórze [101]. Patomechanizm nawrotowej czyraczności nie jest do końca znany. Prezentowana praca miała zatem na celu określenie występowania czynników patogenności wśród gronkowców wywołujących nawrotową czyraczność. Badania prowadzono we współpracy z Kliniką Dermatologii, Wenerologii i Alergologii GUMed. Szczepy *S. aureus* wyizolowano z czyraków o różnej lokalizacji i przebadano na obecność genów enterotoksyn (*sea-sed*), toksyny wstrząsu toksycznego (*tst*), eksfoliatyn (*eta*, *etb*) oraz leukocydyny (*lukS/lukF-PV*). Spośród 44 badanych gronkowców 35 (79,5%) miało geny *lukS/F-PV*, a 12 (27,3%) enetrotoksyny *seb*. Pozostałych genów toksyn nie wykryto. Otrzymane wyniki wskazują na leukocydynę Panton –Valentine (PVL) jako najczęściej występujący czynnik patogenności wśród gronkowców wywołujących nawrotową czyraczność. Częstość występowania *lukS/F-PV* wśród *S. aureus* z czyraków różni się w zależności od regionu geograficznego, od 30% w Afryce Zachodniej, 40% w Japonii, aż do 93% we Francji [4, 63, 114]. Nasze badania wykazały również wysoki jak we Francji odsetek genów PVL w populacji gronkowców w Polsce. Mogło mieć to związek z nawrotowym charakterem zmian u badanych pacjentów. Nawrotom czyraków ze strony gospodarza sprzyjają takie czynniki jak: otyłość, alkoholizm, złe odżywianie, zaburzenia hematologiczne, leczenie kortykosteroidami i cytostatykami oraz cukrzyca [48, 62, 66]. W badanej grupie chorych z czyracznością tylko u dwóch stwierdzono stan predysponujący do nawrotowych infekcji gronkowcowych, była to przewlekła białaczka szpikowa i cukrzyca typu II. Pozostali pacjenci nie byli obciążeni żadnymi schorzeniami ogólnoustrojowymi. Couppie dowiódł, że aż 92% gronkowców z czyraczności nawrotowej wydzielają PVL w porównaniu do 33% szczepów z czyraczności sporadycznej [23]. Sugeruje to, że obecność genów *lukS/F-PV* wśród badanych przez nas

gronkowców odegrała kluczową rolę w nawrotowym charakterze zmian, na które cierpieli wszyscy badani pacjenci.

Tym bardziej jasna wydaje się zależność pomiędzy występowaniem genów leukocydyny PV u *S. aureus*, a zdolnością wywoływania przez nie zmian w nawrotowej czyraczności, że w badanej grupie gronkowców pochodzących od nosicieli nie wykrywaliśmy genów *lukS/F-PV* [Praca 4].

Związek przyczynowy pomiędzy nosicielstwem *S. aureus* a czyracznością znany jest od dawna. Mimo, że najczęstszym czynnikiem etiologicznym zakażenia u chorych na czyraczność są własne szczepy, to w niektórych przypadkach mogą być to szczepy pochodzące z otoczenia [111]. Dlatego chorych na nawrotową czyraczność poddano również badaniu na obecność *S. aureus* w przedsionku nosa i porównano je z grupą kontrolną szczepów wyizolowanych od 150 nosicieli bez czyraczności [Praca 3]. Okazało się, że występowanie *S. aureus* u chorych dotyczyło 61,3% z nich i było ponad dwukrotnie wyższe niż u nosicieli, którzy nie cierpieli na to schorzenie (28,6%). Wyniki te są zgodne z bieżącym piśmiennictwem, które mówi o występowaniu gronkowców nawet u 100% chorych na czyraczność [105]. Wszystkie gronkowce wyizolowane z nosa cierpiących na nawrotową czyraczność charakteryzował taki sam zestaw genów toksyn jak szczepów pochodzących z czyraków. Na tej podstawie można przypuszczać, że w badanych przez nas przypadkach dochodziło do zakażeń autogennych.

Podsumowując, porównanie występowania genów toksyn wśród gronkowców izolowanych ze zmian chorobowych i od nosicieli u ludzi, ujawnia częstszą obecność genu *sea* w grupie szczepów izolowanych z zakażeń oraz genów *lukS/F-PV* wśród szczepów wywołujących nawrotową czyraczność.

Celem kolejnego etapu badań było poszukiwanie zależności pomiędzy pochodzeniem gronkowców izolowanych z zakażeń oraz od nosicieli, a przynależnością do określonej grupy *agr* [Prace 3 i 5]. Badania przeprowadzono na 50 szczepach *S. aureus* wyizolowanych z przedsionka nosa od zdrowych nosicieli oraz na 94 szczepach *S. aureus* pochodzących z różnych zmian chorobowych, w tym na 44 szczepach z nawrotowej czyraczności. Sekwencje zmienne genów *agrC* i *agrD* wykrywano metodą multiplex PCR, badając grupy I z III oraz II z IV. Wśród gronkowców wyizolowanych z próbek materiału klinicznego od chorych połowa reprezentowała grupę IV oraz kolejno II (24%), I (18%) i III (8%). Były to różnice statystycznie znamienne, w porównaniu ze szczepami od nosicieli, gdzie grupy IV i II były najmniej liczne, a najwięcej z nich należało do grupy I (38%) i III (30%). Jarraud podaje, że *S. aureus* wywołujące zespół oparzonej skóry czy liszajec pęcherzowy reprezentują grupę IV

[50]. Dotyczyło to trzech spośród pięciu badanych w prezentowanej pracy szczepów, pochodzących z pęcherzycy noworodków. Pojawiła się natomiast zależność gronkowców izolowanych z czyraków z IV grupą *agr*. Zainspirowani tymi wynikami dalsze badania przeprowadziliśmy na większej grupie szczepów, pochodzących jedynie od pacjentów z nawrotową czyracznością [Praca 3]. Potwierdziły one nasze wcześniejsze spostrzeżenia, bowiem prawie wszystkie badane gronkowce (43/44) należały do IV grupy *agr*. Była to różnica statystycznie znamiennej w porównaniu z kontrolną grupą szczepów pochodzących od zdrowych nosicieli bez czyraczności. Zgodnie z wiedzą autora jest to pierwsza publikacja wykazująca zależność pomiędzy *S. aureus* z nawrotowej czyraczności a IV grupą *agr*. Można przypuszczać, że zjawisko to ma związek z wysoką częstością występowania genów *lukS/F-PV*, których ekspresja podlega locus *agr* [16].

Uzyskane wyniki dowodzą, że szczepy wywołujące nawrotową czyraczność na ogół reprezentują grupę IV *agr*, w odróżnieniu od szczepów od nosicieli, gdzie przeważają grupy I i III.

4.2. Ocena występowania wybranych markerów chorobotwórczości wśród szczepów *S. pseudintermedius* pochodzących ze zmian chorobowych i od nosicieli u psów [Praca 2]

Obok ludzi psy są największym rezerwuarem koagulazododatnich gronkowców, które mogą kolonizować zarówno zdrowe zwierzęta jak i wywoływać u nich infekcje [44, 80]. Celem kolejnego etapu badań było porównanie czynników patogenności szczepów *S. pseudintermedius* pochodzących ze zmian chorobowych i od zdrowych psów [Praca 2]. Badanie przeprowadzono na 71 szczepach wyizolowanych od 172 zdrowych psów, nie wykazujących od co najmniej roku symptomów zakażenia i nie leczonych antybiotykami. Wymazy pobierano z nosa, pyska i odbytu zdrowych psów. Od 197 chorych psów z ewidentnymi objawami zakażenia wyizolowano 120 szczepów, materiały pochodziły z: zapaleń skóry (piodermia powierzchniowa i głęboka, ropnie, n=109), ucha zewnętrznego (n=31), spojówek (n=18), pochwy (n=12), nosa (n=11), gardła (n=10) i moczu (n=6).

Poddano analizie występowanie genów enterotoksyn (*sea-see*), toksyny wstrząsu toksycznego (*tst*), eksfoliatyny (*siet*) i leukotoksyny (*lukS* i *lukF*). Spośród badanych enterotoksyn wykryto jedynie gen enterotoksyny typu C (*sec*) wśród 3 (1,6%) szczepów, dwóch ze zmian chorobowych i jednego z nosicielstwa. W celu ustalenia przynależności do określonego

typu *sec* w dalszym etapie badań produkt amplifikacji poddano sekwencyjnej analizie DNA. Podobnie jak w innych pracach dowiodła ona, że amplifikowany fragment *sec* u wszystkich szczepów należał do typu SEC_{panine} [40, 117]. Znane patogenne działanie SEC_{canine} stanowi niewątpliwie o potencjale chorobotwórczym wyizolowanych szczepów.

Wśród wszystkich szczepów *S. pseudintermedius* wykryto geny toksyny eksfoliatywnej *siet* jak i leukotoksyny *lukS/F*. Były obecne zarówno wśród szczepów pochodzących od psów zdrowych jak i z wszystkimi rodzajami infekcji. Inne prace, podobnie do prezentowanej, wskazują na powszechne występowanie *siet* i *lukS/F* u gronkowców izolowanych z różnych zmian chorobowych [43, 60, 90, 115]. W świetle tych wyników patogenność *S. pseudintermedius* determinowana genami *siet* i *lukS/F* wydaje się niejednoznaczna. Tym bardziej niejasna wydaje się być rola SIET w chorobotwórczości *S. pseudintermedius*, że jak podaje Iyori ostatnio przeprowadzona śródskórna iniekcja rekombinowanej toksyny u trzech psów nie wywołała żadnych zmian klinicznych ani histopatologicznych [49].

Analiza fenotypowa czynników patogenności dowiodła, że ponad 90% szczepów zarówno od psów zdrowych jak i chorych wytwarzało β -hemolizynę, koagulazę, DNazę i lipazę. Nie znaleziono pomiędzy nimi różnic istotnych statystycznie. Odmienne niż w przypadku występowania białka A, które było wykrywane u 14,2% szczepów ze zmian chorobowych i zaledwie u 1,4% szczepów od nosicieli ($p=0,004$). Białko A (SpA) należy do grupy białek związanych ze strukturami adhezyjnymi ściany komórkowej. Jedna jego część jest kowalencyjnie połączona z mureiną, druga zaś zawiera miejsca o wysokim powinowactwie do regionu Fc przeciwciał klasy IgG. Oddziaływanie białka A powoduje nieprawidłową orientację przeciwciał, które nie są rozpoznawane przez receptory neutrofilii i białka klasycznej drogi aktywacji dopełniacza. To zapewnia jego właściwości antyfagocytarne i decyduje o patogenności [75]. Białko A występuje głównie wśród szczepów *S. aureus*, w mniejszym odsetku u dawnego gatunku *S. intermedius* [38]. Dotąd było brak danych na temat szczepów *S. pseudintermedius*. Według wiedzy autora jest to pierwsza praca badająca wytwarzanie białka A metodą dot blot, na dużej liczbie szczepów *S. pseudintermedius*. Nasze wyniki jednoznacznie pokazują, że białko A jest częściej wytwarzane przez szczepy pochodzące z procesów zakażenia, niż od zdrowych psów. Dotąd wyniki takie odnotowano dla szczepów *S. aureus* [75].

W prezentowanej pracy dodatkowo zbadano wytwarzanie biofilmu, jako istotnego determinanta gronkowcowej patogenności. Biofilm jest polisacharydową substancją o charakterze amorficznego śluzu, w którym zanurzone są komórki bakterii. Gronkowce mogą go tworzyć zarówno na powierzchni tkanek gospodarza jak również na powierzchniach abiotycznych. Biofilm sprzyja przetrwaniu bakterii, chroniąc je przed czynnikami fizykochemicznymi

oraz mechanizmami odpornościowymi gospodarza. W wyniku fragmentacji i odklejania biofilmu bakterie rozprzestrzeniają się w organizmie zasiedlając nowe miejsca, co przyczynia się do przewlekłości i nawrotów zakażenia [118]. Dość dobrze zbadane jest wytwarzanie biofilmu przez szczepy *S. aureus* czy *S. epidermidis*, natomiast tylko nieliczne publikacje dotyczą badania biofilmu u gronkowców *S. pseudintermedius* [74]. W prezentowanej pracy zbadano zdolność wytwarzania biofilmu na dużej liczbie szczepów *S. pseudintermedius*, przy zastosowaniu metody płytek mikrotitracyjnych. Wykazała ona, że badane gronkowce wytwarzały w większości średnie lub duże ilości biofilmu i nie było różnic statystycznie znamiennej pomiędzy szczepami pochodzącymi ze zmian chorobowych i od nosicieli. Otrzymane wyniki sugerują, że wytwarzanie biofilmu może odgrywać rolę nie tylko podczas infekcji wywołanych przez *S. pseudintermedius*, ale również w zjawisku nosicielstwa. W prezentowanej pracy stwierdzono również, że szczepy wyizolowane z psich zapaleń spojówek wytwarzały duże ilości biofilmu. Dotąd ustalono, że biofilm odgrywa niezaprzeczalną rolę w infekcjach oka u ludzi wywołanych przez gronkowce [118]. Gronkowce z grupy *S. intermedius* są najczęstszą przyczyną zapaleń worka spojówkowego u psów [37, 86, 108]. Zgodnie z wiedzą autora jest to pierwsza praca dowodząca wytwarzania dużych ilości biofilmu przez szczepy *S. pseudintermedius* wywołujące u psów zapalenia spojówek.

Podsumowując, geny badanych toksyn występują z podobną częstością wśród szczepów *S. pseudintermedius* izolowanych ze zmian chorobowych i od nosicieli. Jedyna wykrywana enterotoksyna należał do typu SEC_{canine}. Wśród szczepów izolowanych ze zmian chorobowych od psów częściej występuje białko A niż wśród szczepów pochodzących od nosicieli.

4.3. Występowanie genów toksyn wśród gronkowców złocistych fagotypu 187 oraz analiza polimorfizmu fragmentów restrykcyjnych *pta/MboI* [Praca 6 i 1]

Do badań patogenności koagulazodatnich gronkowców pochodzących od ludzi i od psów włączono także gronkowce złociste fagotypu 187, będące grupą o właściwościach pośrednich pomiędzy biotypem ludzkim i psim. Zgodnie z wiedzą autora nie były one przedmiotem badań od 30 lat. Jedną z cyklu prezentowanych prac miała na celu ocenę występowania genów toksyn wśród szczepów fagotypu 187 pochodzących od ludzi [Praca 6]. Badaniami objęto 16 *S. aureus* fagotypu 187, wyizolowanych na przestrzeni 15 lat (1991-2005) spośród 904 gronkowców złocistych, typowanych w Ośrodku Typowania Fagowego Zakładu Mikro-

biologii Lekarskiej GUMed. Szczepy pochodziły od 12 pacjentów szpitalnych z różnych zmian chorobowych oraz od 4 nosicieli.

Szczepy zakwalifikowane do analizy były niewrażliwe na wszystkie 23 fagi, z wyjątkiem faga 187. Na przestrzeni 15 lat wyizolowano ich zaledwie 16, co potwierdza dane o ich sporadycznym występowaniu (1,7%). Wykrywano geny enterotoksyn (*sea-sed*) i toksyny wstrząsu toksycznego (*tst*). Niemalże wszystkie posiadały geny *sec* i *tst*, tylko jeden szczep miał dodatkowo gen *seb*. Nie stwierdzono różnic w występowaniu genów toksyn pomiędzy szczepami izolowanymi ze zmian chorobowych i od nosicieli. Jednorodność grupy 187 pod względem wykrytych czynników patogenności skłoniła do zbadania pokrewieństwa wyizolowanych szczepów. Homogenność fagotypu 187 wykazały jednakowe wzory restrykcyjne fragmentów zmiennych genu koagulazy (*coa*) i białka A (*spa*). Dla *coa* były to fragmenty: 81, 162 i 405 pz, a dla genu *spa*: 140, 170 i 307 pz. Makrorestrykcyjna analiza chromosomalnego DNA metodą PFGE potwierdziła klonalny charakter badanej populacji. Niemalże wszystkie szczepy należały do typu A, z siedmioma podtypami, A1-A7. Jeden izolat oznaczony wzorem B/B1 był niespokrewniony z pozostałymi, o czym świadczyła również obecność genu *seb*. Uzyskane wyniki dowdzą, że gronkowce typu 187 są izolatami jednego szczepu, który jest rozprzestrzeniony na terenie Polski od co najmniej kilkunastu lat. Nieznaczne zróżnicowanie typu A na siedem podtypów może świadczyć o stopniowej ewolucji epidemicznego szczepu. Klonalna natura *S. aureus* fagotypu 187 wydaje się wyjaśniać ich jednorodny potencjał chorobotwórczy. Wcześniejsze badania nad patogennością fagotypów *S. aureus* wykazały, że gronkowce fagotypu 71 wytwarzają eksfoliatyny, fagotypu 29 produkują TSST-1, a należące do III grupy fagowej cechuje wytwarzanie enterotoksyn [76]. Wydaje się, że podobna zależność istnieje wśród gronkowców fagotypu 187 niosących geny *tst* i *sec*. Wymagałoby dalszych badań ustalenie czy wykryta w prezentowanej pracy korelacja ma związek jedynie z opisywanym klonem gronkowców, czy odnosi się do całej populacji fagotypu 187.

W badaniach prowadzonych przez Kryńskiego ustalono, że gronkowce fagotypu 187, izolowane od ludzi mają jednocześnie właściwości gronkowców biotypu ludzkiego (A) i psiego (E) [56, 57]. W celu sprawdzenia czy cecha ta utrzymuje się nadal w badanej populacji gronkowców, w prezentowanej pracy określono wytwarzanie fibrynolizyny, hemolizyny α i β , czynnika zlepnego, białka A, DNazy, acetoiny i ureazy, koagulowanie plazmy ludzkiej, psiej i króliczej oraz fermentację mannitolu. Wszystkie szczepy, w sposób charakterystyczny dla gatunku *S. aureus* wytwarzały żółty barwnik, czynnik zlepnący, DNazę, koagulowały plazmę ludzką oraz fermentowały mannitol. Część z nich produkowała białko A (93,8%), fibrynolizynę (87,5%), koagulowała plazmę króliczą (75%) oraz wytwarzała hemolizynę α (62,5%).

Mimo, iż pochodziły od ludzi wykazywały równocześnie właściwości typowe dla gronkowców psich, nie wytwarzały ureazy (100%), acetoiny (37,5%), koagulowały plazmę psią (37,5%) i wytwarzały hemolizynę β (18,8%). Dowodzi to, że izolowane obecnie od ludzi gronkowce fagotypu 187 wykazują właściwości gronkowców psich z grupy *S. intermedius*.

Uzyskane wyniki skłoniły nas do porównania gronkowców fagotypu 187 z innymi *S. aureus* izolowanymi od ludzi i od psów oraz ze szczepami grupy *S. intermedius* izolowanymi od psów, w oparciu o inną metodę niż fenotypowa [Praca 1]. Wybrano do tego technikę polimorfizmu fragmentów restrykcyjnych genu *pta* (PCR-RFLP), która od czterech lat jest najczęściej wykorzystywaną metodą identyfikacji gatunków w obrębie grupy *S. intermedius* [7, 43, 91, 115, 116, 117]. Technika ta opiera się na polimorfizmie fragmentów restrykcyjnych fragmentu zmiennego genu acetylotransferazy fosforanowej (*pta*) przy użyciu restryktazy *MboI* [7]. Amplifikowany fragment wielkości 320 pz szczepów gatunku *S. pseudintermedius* jest cięty na dwa fragmenty restrykcyjne 213 pz i 107 pz, w odróżnieniu od szczepów *S. intermedius* i *S. delphini*, które nie podlegają cięciu restryktazą *MboI*. Dodatkowo, w przypadku szczepów *S. aureus*, fragment genu *pta* podlega odmiennemu cięciu na fragmenty 156 pz i 164 pz, co pozwala je odróżnić od szczepów grupy *S. intermedius* (SIG).

Przeprowadzona analiza restrykcyjna dała zaskakujący wynik w grupie gronkowców fagotypu 187. Okazało się, że w przypadku wszystkich szczepów amplifikowany fragment genu *pta* nie podlegał cięciu restryktazą *MboI*. Porównano te wyniki z grupą kontrolną 150 szczepów *S. aureus* o innych fagotypach. U wszystkich z nich produkt amplifikacji *pta* podlegał typowemu cięciu *MboI*. *S. pseudintermedius* pochodzące od psów również miały typowe fragmenty restrykcyjne. Wynika z tego, że fragment zmienny genu *pta* gronkowców fagotypu 187 jest podobny do szczepów *S. intermedius*, a nie do *S. aureus*. Sugeruje to, że pewne właściwości genotypowe tego fagotypu, podobnie jak fenotypowe, są bliższe psiemu gatunkowi *S. intermedius*, niż *S. aureus*, do którego formalnie należą.

Drugim istotnym aspektem prezentowanych badań jest dowiedzenie, że metoda fragmentów restrykcyjnych *pta/MboI*, ze względu na istnienie takich szczepów jak *S. aureus* typu 187 może dawać wyniki fałszywe. Do momentu wprowadzenia tej techniki jedynym sposobem rozróżniania szczepów w obrębie grupy *S. intermedius* było sekwencjonowanie genów *sodA* i *hsp60* [92]. Żadna fenotypowa metoda nie pozwalała na trafną identyfikację tych gatunków. Dlatego szybka i łatwa technika PCR-RFLP znalazła szerokie zastosowanie i jest obecnie najpowszechniej stosowaną metodą identyfikacji gatunków w obrębie grupy *S. intermedius* [7, 43, 91, 115, 116, 117]. Jak dowodzą nasze badania, przy jej użyciu, szczepy gatunku *S. aureus* i *S. intermedius* mogą zostać mylnie zidentyfikowane. Zdaniem Slettemeås'a meto-

da *pta/MboI* może błędnie identyfikować niektóre szczepy z grupy *S. intermedius* [97]. Badane przez nas gronkowce typu 187 mogłyby zostać pomyłone z gatunkiem *S. intermedius* bądź *S. delphini*. Tym bardziej, że typ 187 może być izolowany od psów, podobnie jak gronkowce grupy *S. intermedius*.

Przeprowadzone badania nad szczepami fagotypu 187 dowodzą, że stanowią one klon gronkowców niosących geny enterotoksyny C i TSST-1. Dotychczasowa wiedza na ich temat i uzyskane przez nas wyniki analizy polimorfizmu genu *pta* dowodzą, że są grupą o odrębnym właściwościach zarówno fenotypowych jak i genotypowych od *S. aureus*. Być może, odmienność gronkowców fagotypu 187, ma związek z możliwością jego alternatywnej adaptacji do dwóch różnych gospodarzy, jakimi są człowiek i pies. Wymaga dalszych badań określenie czy stanowią, jak to już wcześniej postulowano, odrębną jednostkę taksonomiczną.

5. PODSUMOWANIE

Cykl prezentowanych prac miał na celu analizę występowania czynników patogenności wśród koagulazododatnich gronkowców w odniesieniu do populacji pochodzącej ze zmian chorobowych i od nosicieli. Określenie różnic pomiędzy szczepami bytującymi w zdrowym organizmie a wywołującymi zmiany chorobowe daje możliwość poznania pewnych uwarunkowań chorobotwórczości koagulazododatnich gronkowców. Nie ograniczając się jedynie do gronkowców wywołujących zakażenia u ludzi, przedstawiona analiza dotyczy również gatunków wywołujących zakażenia u psów oraz gronkowców złocistych fagotypu 187, mogących zakażać zarówno ludzi jak i psy. Przeprowadzone badania dowodzą, że gronkowce złociste pochodzące ze zmian chorobowych u ludzi częściej cechowała obecność genu enterotoksyny A (*sea*) niż szczepy od nosicieli. *S. aureus* wywołujące nawrotową czyraczność niosą na swoim chromosomie geny leukocydyny Panton-Valentine, podczas gdy w grupie od nosicieli nie wykrywa się ich wcale. Różnica pomiędzy gronkowcami izolowanymi od ludzi dotyczyła też polimorfizmu w systemie regulacji ekspresji genów toksyn – *agr*. Grupy I i III *agr* występowały statystycznie rzadziej wśród szczepów ze zmian chorobowych, w szczególności dotyczyło to szczepów z nawrotowej czyraczności, które reprezentowały grupę IV. Prezentowana publikacja jest pierwszym doniesieniem na ten temat w dotychczasowym piśmiennictwie.

Szczepy gronkowców izolowane ze zmian chorobowych od psów częściej cechowała produkcja białka A niż szczepy pochodzące od nosicieli. Pozostałe markery patogenności występowały z podobną częstością w obu grupach. Jedyna wykrywana enterotoksyna należała do typu SEC_{canine}. Szczepy wywołujące u psów zapalenia spojówek wytwarzały duże ilości biofilmu.

Unikatowe badania gronkowców fagotypu 187 dowiodły, że zarówno szczepy od nosicieli jak i pochodzące ze zmian chorobowych stanowią klon niosący geny enterotoksyny C i TSST-1. Dotychczasowa wiedza na ich temat i uzyskane przez nas wyniki analizy polimorfizmu genu *pta* dowodzą, że są grupą o odrębnych właściwościach zarówno fenotypowych jak i genotypowych od *S. aureus*.

Przeprowadzone badania pokazały, że pewne determinanty patogenności mają związek ze szczepami gronkowców wywołującymi zmiany chorobowe, zaś inne mogą występować zarówno w grupie od nosicieli jak i ze zmian chorobowych. Biorąc pod uwagę złożoność i wieloczynnikowość procesu infekcji można przypuszczać, że obok czynników patogenności gronkowca istotnym elementem pozostają predyspozycje i mechanizmy obronne gospodarza.

6. WNIOSKI

1. Wśród *S. aureus* pochodzących ze zmian chorobowych od ludzi częściej występują geny enterotoksyna A (*sea*) niż wśród szczepów od nosicieli.
2. Geny leukocydyny PV (*lukS/F-PV*) są związane ze szczepami *S. aureus* wywołującymi nawrotową czyraczność u ludzi i nie występują wśród gronkowce pochodzących od nosicieli.
3. Szczepy wywołujące nawrotową czyraczność reprezentują grupę IV *agr*, w odróżnieniu od szczepów od nosicieli, gdzie przeważają grupy I i III.
4. Szczepy *S. pseudintermedius* wywołujące zakażenia u psów częściej wytwarzają białko A niż szczepy kolonizujące zdrowe zwierzęta.
5. Gronkowców złociste fagotypu 187, pochodzące zarówno ze zmian chorobowych i od nosicieli stanowią jeden klon, niosący geny enterotoksyny C i TSST-1.
6. Gronkowców złociste fagotypu 187 wykazują właściwości fenotypowe i genotypowe pośrednie pomiędzy gatunkami *S. aureus* i grupą *S. intermedius*.

7. PIŚMIENICTWO

1. 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, 625-631.
2. Ammerlaan H.S., Kluytmans J.A., Wertheim H.F., Nouwen J.L., Bonten M.J.: Eradication of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carriage: a systematic review. *Clin. Infect. Dis.* 2009, 48, 922-930.
3. Arciola C.R., Baldassarri L., Von Eiff C., Campoccia D., Ravaioli S., Pirini V., Becker K., Montanaro L.: Prevalence of genes encoding for staphylococcal leukocidal toxins among clinical isolates of *Staphylococcus aureus* from implant orthopedic infections. *Int. J. Artif. Organs* 2007, 30, 792-797.
4. Baba Mussa L., Sanni A., Dagnra A.Y.: Approche épidémiologique de l'antibiorésistance et de la production de leucotoxines par les souches de *Staphylococcus aureus* isolées en Afrique de l'Ouest. *Med. Mal. Infect.* 1999, 29, 689-696.
5. Baird-Parker A.C.: A classification of micrococci and staphylococci based on physiological and biochemical tests. *J. Gen. Microbiol.* 1963, 30, 409-427.
6. 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.
7. Bannoehr J., Franco A., Iurescia M., Battisti A., Fitzgerald J.R.: Molecular diagnostic identification of *Staphylococcus pseudintermedius*. *J. Clin. Microbiol.* 2009, 47, 469-471.
8. Bannoehr J., Guardabassi L.: *Staphylococcus pseudintermedius* in the dog: taxonomy, diagnostics, ecology, epidemiology and pathogenicity. *Vet. Dermatol.* 2012, 23, 253-266.
9. Baron F., Cochet M.F., Pellerin J.L., Ben Zakour N., Lebon A., Navarro A., Proudy I., Le Loir Y., Gautier M.: Development of a PCR test to differentiate between *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus intermedius*. *J. Food Prot.* 2004, 67, 2302-2305.
10. Becker K., Keller B., von Eiff C., Bruck M., Lubritz G., Etienne J., Peters G.: Enterotoxigenic potential of *Staphylococcus intermedius*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2001, 67, 5551-5557.
11. Becker K., Roth R., Peters G.: Rapid and specific detection of toxigenic *Staphylococcus aureus*: use of two multiplex PCR enzyme immunoassays for amplification and hybridization of staphylococcal enterotoxin genes, exfoliative toxin genes, and toxic shock syndrome toxin 1 gene. *J. Clin. Microbiol.* 1998, 36, 2548-2553.
12. Bergdoll M.S., Crass B.A., Reiser R.F., Robbins R.N., Davis J.P.: A new staphylococcal enterotoxin, enterotoxin F, associated with toxic-shock-syndrome *Staphylococcus aureus* isolates. *Lancet* 1981, 9, 1017-1021.
13. Betley M.J., Mekalanos J.J.: Staphylococcal enterotoxin A is encoded by phage. *Science* 1985, 229, 185-187.

14. Bibel D.J., Aly R., Shinefield H.R., Maibach H.I., Strauss W.G.: Importance of the keratinized epithelial cell in bacterial adherence. *J. Invest. Dermatol.* 1982, 79, 250-253.
15. Blair J.E., Williams R.E.O.: Phage typing of staphylococci. *WHO Bulletin* 1961, 24, 771-778.
16. Bronner S., Monteil H., Prevost G.: Regulation of virulence determinants in *Staphylococcus aureus*: complexity and applications. *FEMS Microb. Rev.* 2004, 28, 183-200.
17. Brosnahan A.J., Schlievert P.M.: Gram-positive bacterial superantigen outside-in signaling causes toxic shock syndrome. *FEBS J.* 2011, 278, 4649-4667.
18. Casanova C., Iselin L., von Steiger N., Droz S., Sendi P.: *Staphylococcus hyicus* bacteremia in a farmer. *J. Clin. Microbiol.* 2011, 49, 4377-4378.
19. Chapoutot C., Pageaux G.P., Perrigault P.F., Joomaye Z., Perney P., Jean-Pierre H., Jonquet O., Blanc P., Larrey D.: *Staphylococcus aureus* nasal carriage in 104 cirrhotic and control patients. A prospective study. *J. Hepatol.* 1999, 30, 249-253.
20. 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.
21. Cole A.M., Dewan P., Ganz T.: Innate antimicrobial activity of nasal secretions. *Infect. Immun.* 1999, 67, 3267-3275.
22. Cole A.M., Tahk S., Oren A., Yoshioka D., Kim Y.H., Park A., Ganz T.: Determinants of *Staphylococcus aureus* nasal carriage. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2001, 8, 1064-1069.
23. Couppie P., Cribier B., Prévost G.: Leukocidin from *Staphylococcus aureus* and cutaneous infections: an epidemiologic study. *Arch. Dermatol.* 1994, 130, 1208-1209.
24. Cox H.U., Hoskins J.D., Newman S.S., Foil C.S., Turnwald G.H., Roy A.F.: Temporal study of staphylococcal species on healthy dogs. *Am. J. Vet. Res.* 1988, 49, 747-51.
25. Dauwalder O., Thomas D., Ferry T., Debard A.L., Badiou C., Vandenesch F., Etienne J., Lina G., Monneret G.: Comparative inflammatory properties of staphylococcal superantigenic enterotoxins SEA and SEG: implications for septic shock. *J. Leukoc. Biol.* 2006, 80, 753-758.
26. Devriese L.A.: A simplified system for biotyping *Staphylococcus aureus* strains isolated from animal species. *J. Appl. Bacteriol.* 1984, 56, 215-220.
27. 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, 457-465.
28. Devriese L.A., Vancanneyt M., Baele M., Vaneechoutte M., De Graef E., Snauwaert C., Cleenwerck I., Dawyndt P., Swings J., Decostere A., Haesebrouck F.: *Staphylococcus pseudintermedius* sp. nov., a coagulase-positive species from animals. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2005, 55, 1569-1573.
29. Dinges M.M., Orwin P.M., Schlievert P.M.: Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin. Microbiol. Rev.* 2000, 13, 16-34.
30. Edwards V.M., Deringer J.R., Callantine S.D., Deobald C.F., Berger P.H., Kapur V., Stauffacher C.V., Bohach G.A.: Characterization of the canine type C enterotoxin

- produced by *Staphylococcus intermedius* pyoderma isolates. Infect. Immun. 1997, 65, 2346-2352.
31. Eriksen N.H., 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.
 32. 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, 464-466.
 33. Fazakerley J., Nuttall T., Sales D., Schmidt V., Carter S.D., Hart C.A., McEwan N.A.: Staphylococcal colonization of mucosal and lesional skin sites in atopic and healthy dogs. Vet. Dermatol. 2009, 20, 179-184.
 34. Ferreira J.P., Anderson K.L., Correa M.T., Lyman R., Ruffin F., Reller L.B., Fowler V.G.: Transmission of MRSA between companion animals and infected human patients presenting to outpatient medical care facilities. PLoS One. 2011, 11, e26978.
 35. Ferry T., Thomas D., Genestier A.L., Bes M., Lina G., Vandenesch F., Etienne J.: Comparative prevalence of superantigen genes in *Staphylococcus aureus* isolates causing sepsis with and without septic shock. Clin. Infect. Dis. 2005, 41, 771-777.
 36. Frénay H.M.E., Bunschoten A.E., Schouls L.M., van Leeuwen W.J., Vandenbrouke – 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.
 37. Furiani N., Scarpampella F., Martino P.A., Panzini I., Fabbri E., Ordeix L.: Evaluation of the bacterial microflora of the conjunctival sac of healthy dogs and dogs with atopic dermatitis. Vet. Dermatol. 2011, 22, 490-496.
 38. Futagawa-Saito K., Ba-Thein W., Sakurai N., Fukuyasu T.: Prevalence of virulence factors in *Staphylococcus intermedius* isolates from dogs and pigeons. BMC Vet. Res. 2006, 26, 2-7.
 39. Futagawa-Saito K., Sugiyama T., Karube S., Sakurai N., Ba-Thein W., Fukuyasu T.: Prevalence and characterization of leukotoxin-producing *Staphylococcus intermedius* in isolates from dogs and pigeons. J. Clin. Microbiol. 2004, 42, 5324-5326.
 40. Futagawa-Saito K., Suzuki M., Ohsawa M., Ohshima S, Sakurai N., Ba-Thein W., Fukuyasu T.: Identification and prevalence of an enterotoxin-related gene, se-int, in *Staphylococcus intermedius* isolates from dogs and pigeons. J. Appl. Microbiol. 2004, 96, 1361-1366.
 41. Garbacz K., Piechowicz L., Żarnowska S., Haras K.: Staphylococci isolated from carriage sites and infected sites of dogs as a reservoir of multidrug resistance and methicillin resistance. Curr. Microbiol. 2013, 66, 169-73.
 42. Goh S.H., Byrne S.K., Zang J.L., Chow W.: Molecular typing of *Staphylococcus aureus* on the basis of coagulase gene polymorphisms. J. Clin. Microbiol. 1992, 30, 1642-1645.
 43. Gómez-Sanz E., Torres C., Lozano C., Sáenz Y., Zarazaga M.: Detection and characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in healthy dogs in La Rioja, Spain. Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. 2011, 34, 447-453.

44. Griffeth G.C., Morris D.O., Abraham J.L., Shofer F.S., Rankin S.C.: Screening for skin carriage of methicillin-resistant coagulase-positive staphylococci and *Staphylococcus schleiferi* in dogs with healthy and inflamed skin. *Vet. Dermatol.* 2008, 19, 142-149.
45. Hájek V.: *Staphylococcus intermedius*, a new species isolated from animals. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1976, 26, 401-408.
46. 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.
47. Hartmann F.A., White D.G., West S.E., Walker R.D., Deboer D.J.: Molecular characterization of *Staphylococcus intermedius* carriage by healthy dogs and comparison of antimicrobial susceptibility patterns to isolates from dogs with pyoderma. *Vet. Microbiol.* 2005, 108, 119-31.
48. Hsu C.T., Lin Y.T., Yang Y.H., Chiang B.L.: The hyperimmunoglobulin E syndrome. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 2004, 37, 121-123.
49. Iyori K., Futagawa-Saito K., Hisatsune J., Yamamoto M., Sekiguchi M., Ide K., Son W.G., Olivry T., Sugai M., Fukuyasu T., Iwasaki T., Nishifuji K.: *Staphylococcus pseudintermedius* exfoliative toxin EXI selectively digests canine desmoglein 1 and causes subcorneal clefts in canine epidermis. *Vet. Dermatol.* 2011, 22, 319-326.
50. Jarraud S., Mougel C., Thioulouse J., Lina G., Meugnier H., Forey F., Nesme X., Etienne J., Vandenesch F.: Relationships between *Staphylococcus aureus* genetic background, virulence factors, *agr* groups (alleles), and human disease. *Infect. Immun.* 2002, 70, 631-641.
51. Jeliaszewicz J., Świtalski 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, 525-557.
52. Kaliner M.A.: Human nasal host defense and sinusitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1992, 90, 424-430.
53. 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, 35-48.
54. Kikuchi K., Karasawa T., Piao C., Itoda I., Hidai H., Yamaura H., Totsuka K., Morikawa T., Takayama M.: Molecular confirmation of transmission route of *Staphylococcus intermedius* in mastoid cavity infection from dog saliva. *J. Infect. Chemother.* 2004, 10, 46-48.
55. Kretzschmar W.: Some new aspects of serological typing of *Staphylococcus aureus*. *Contrib. Microb. Immunol.* 1973, 1, 509-514.
56. Kryński S., Becla E., Pytasz Z., Malanowski J.: Mass carrier state of *Staphylococcus aureus* type 187 of canine origin in a neonatal ward. *Przegl. Epidemiol.* 1981, 35, 517-520.
57. Kryński S., Galiński J., Becla E.: Phage type 187 as a separate taxonomic subunit within the *Staphylococcus aureus* species. In: Jeliaszewicz J (ed) *Staphylococcus and Staphylococcal Diseases*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York, 1976, pp 57-62.
58. Krzywińska E., Piechowicz L., Galiński J.: Prevalence of phage group II in *Staphylococcus aureus* human strains. *Med. Dośw. Mikrobiol.* 1999, 51, 25-30.

59. 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.
60. Lautz S., Kanbar T., Alber J., Lammler C., Weiss R., Prenger-Berninghoff E., Zschock M.: Dissemination of the gene encoding exfoliative toxin of *Staphylococcus intermedius* among strains isolated from dogs during routine microbiological diagnostics. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health.* 2006, 53, 434-438.
61. Lee J.: *Staphylococcus intermedius* isolated from dog-bite wounds. *J. Infect.* 1994, 29, 105.
62. Levy R., Shriker O., Poath A.: Witamin C for the treatment of recurrent furunculosis in patients with impaired neutrophil functions. *J. Infect. Dis.* 1996, 173, 1502-1505.
63. Lina G., Piémont Y., Godail-Gamot F., Bes M., Peter M.O., Gauduchon V., Vandenesch F., Etienne J.: Involvement of Panton-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. *Clin. Infect. Dis.* 1999, 29, 1128-1132.
64. Live I.: Relationship of antigen k to *Staphylococcus aureus* bacteriophage type 187, of human and of canine origins. *Infect. Immun.* 1973, 7, 473-475.
65. Loeb L.: The influence of certain bacteria on the coagulation of the blood. *J. Med. Res.* 1903, 10, 407-419.
66. Mahé E., Griszin N., Descamps V., Cricx B.: Furunculosis and IgG subclass deficiency. *Dermatology* 2004, 208, 84-85.
67. Maršálek E., Hájek V.: The classification of pathogenic staphylococci. W: *Staphylococci and Staphylococcal Infections. Recent Progress.* J. Jeliaszewicz, Basel, Karger S, 1973, 30-37.
68. 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, 1032–1035.
69. Moore P.C.L., Lindsay J.A.: Genetic variation among hospital isolates of methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*: evidence for horizontal transfer of virulence genes. *J. Clin. Microbiol.* 2001, 39, 2760-2767.
70. Nouwen J., Boelens H., van Belkum A., Verbrugh H.: Human factor in *Staphylococcus aureus* nasal carriage. *Infect. Immun.* 2004, 72, 6685-6688.
71. Oeding P.: Cellular antigens of staphylococci. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1974, 31, 15-21.
72. 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.
73. Ogston A.: Über Abscesse. *Archiv für Klinische Chirurgie* 1880, 25, 588-600.
74. Osland A.M., Vestby L.K., Fanuelson H., Slettemeas J.S., Sunde M.: Clonal diversity and biofilm-forming ability of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*. *J. Antimicrob. Chemother.* 2012, 67, 841-848.
75. Palmqvist N., Foster T., Tarkowski A., Josefsson E.: Protein A is a virulence factor in *Staphylococcus aureus* arthritis and septic death. *Microb. Pathog.* 2002, 33, 239-249.
76. Parker M.T.: The significance of phage-typing patterns in *Staphylococcus aureus*. *Staphylococci and Staphylococcal Infect.* 1983, 1, 33-62.

77. Peacock S.J., Justice A., Griffiths D., de Silva G.D., Kantzanou M.N., Crook D., Sleeman K., Day N.P.: Determinants of acquisition and carriage of *Staphylococcus aureus* in infancy. *J. Clin. Microbiol.* 2003, 12, 5718-5725.
78. Peacock S.J., Moore C.E., Justice A., Kantzanou M., Story L., Mackie K., O'Neill G., Day N.P.: Virulent combinations of adhesin and toxin genes in natural populations of *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* 2002, 70, 4987-4996.
79. Penna B., Vargas R., Martins R., Martins G., Lilenbaum W.: In vitro antimicrobial resistance of staphylococci isolated from canine urinary tract infection. *Can. Vet. J.* 2010, 51, 738-742.
80. Penna B., Vargas R., Medeiros L., Martins G.M., Martins R.R., Lilenbaum W.: Species distribution and antimicrobial susceptibility of staphylococci isolated from canine otitis externa. *Vet. Dermatol.* 2010, 21, 292-296.
81. Perl T.M., Cullen J.J., Wenzel R.P., Zimmerman M.B., Pfaller M.A., Sheppard D., Twombly J., French P.P., Herwaldt L.A.: Intranasal mupirocin to prevent postoperative *Staphylococcus aureus* infections. Mupirocin And The Risk Of *Staphylococcus aureus* Study Team. *N. Engl. J. Med.* 2002, 24, 1871-1877.
82. Peschel A.: How do bacteria resist human antimicrobial peptides? *Trends Microbiol.* 2002, 10, 179-86.
83. Piechowicz L., Garbacz K., Dajnowska-Stanczewska A., Galiński J.: Phage types of *Staphylococcus aureus* isolated in Poland in 1999-2004. *Med. Dośw. Mikrobiol.* 2005, 57, 105-113.
84. Pinchuk I.V., Beswick E.J., Reyes V.E.: Staphylococcal enterotoxins. *Toxins (Basel)*, 2010, 8, 2177-2197.
85. Plommet M., Plommet A.M.: Serotyping of bovine staphylococci. *Ann. Inst. Pasteur (Paris)*. 1970, 118, 143-157.
86. Prado M.R., Rocha M.F., Brito E.H., Girao M.D., Monteiro A.J., Teixeira M.F., Sidrim J.J.: Survey of bacterial microorganisms in the conjunctival sac of clinically normal dogs and dogs with ulcerative keratitis in Fortaleza, Ceara, Brazil. *Vet. Ophthalmol.* 2005, 8, 33-37.
87. Prevost G., Bouakham T., Piemont Y., Monteil H.: Characterisation of a synergohymenotropic toxin produced by *Staphylococcus intermedius*. *FEBS Lett.* 1995, 376, 135-140.
88. Rosenbach F.J.: Mikroorganismen bei den Wundinfektionskrankheiten des menschen. Wiesbaden: J.F. Bergmann. 1884.
89. Rubin J.E., Chirino-Trejo M.: Prevalence, sites of colonization, and antimicrobial resistance among *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from healthy dogs in Saskatoon, Canada. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2011, 23, 351-354.
90. Ruscher C., Lübke-Becker A., Semmler T., Wleklinski C.G., Paasch A., Soba A., Stamm I., Kopp P., Wieler L.H., Walther B.: Widespread rapid emergence of a distinct methicillin- and multidrug-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* (MRSP) genetic lineage in Europe. *Vet. Microbiol.* 2010, 144, 340-346.
91. Ruscher C., Lübke-Becker A., Wleklinski C.G., Soba A., Wieler L.H., Walther B.: Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from

- clinical samples of companion animals and equidae. *Vet. Microbiol.* 2009, 136, 197-201.
92. Sasaki T., Kikuchi K., Tanaka Y., Takahashi N., Kamata S., Hiramatsu K.: Reclassification of phenotypically identified *Staphylococcus intermedius* strains. *J. Clin. Microbiol.* 2007, 45, 2770-2778.
 93. Schlievert P.M., Shands K.N., Dan B.B., Schmid G.P., Nishimura R.D.: Identification and characterization of an exotoxin from *Staphylococcus aureus* associated with toxic-shock syndrome. *J. Infect. Dis.* 1981, 143, 509-516.
 94. Shopsin B., Mathema B., Alcabes P.: Prevalence of *agr* specificity groups among *Staphylococcus aureus* strains colonizing children and their guardians. *J. Clin. Microbiol.* 2003, 41, 456-459.
 95. Shuter J., Hatcher V.B., Lowy F.D.: *Staphylococcus aureus* binding to human nasal mucin. *Infect. Immun.* 1996, 1, 310-318.
 96. Sierra G.: A simple method for the detection of lipolytic activity of micro-organisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. *Antonie van Leeuwenhoek* 1957, 23, 15-22.
 97. Slette-meås J.S., Mikalsen J., Sunde M.: Further diversity of the *Staphylococcus intermedius* group and heterogeneity in the MboI restriction site used for *Staphylococcus pseudintermedius* species identification. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2010, 22, 756-759.
 98. 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.
 99. Stepanovic S., Vukovic D., Hola V., Di Bonaventura G., Djukic S., Cirkovic I., Ruzicka F.: Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS* 2007, 115, 891-899.
 100. 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.
 101. Swartz M.N.: Furuncles and carbuncles; in Mandel G.L., Bennett J.E., Dolin R.(eds): Mandel, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases, ed. 4. New York, Churchill Livingstone, 1995, 912-913.
 102. Tanner M.A., Everett C.L., Youvan D.C.: Molecular phylogenetic evidence for non-invasive zoonotic transmission of *Staphylococcus intermedius* from a canine pet to a human. *J. Clin. Microbiol.* 2000, 38, 1628-1631.
 103. 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.
 104. Terauchi R., Sato H., Hasegawa T., Yamaguchi T., Aizawa C., Maehara N.: Isolation of exfoliative toxin from *Staphylococcus intermedius* and its local toxicity in dogs. *Vet. Microbiol.* 2003, 94, 19-29.

105. Toshkova K., Annemüller C., Akineden O., Lämmle C.: The significance of nasal carriage of *Staphylococcus aureus* as risk factor for human skin infections. FEMS Microbiol. Lett. 2001, 1, 17-24.
106. Trafny E.A.: Rola bakterii w zakażeniach w ortopedii. Sepsis 2009, 2, 123-127.
107. Tristan A., Ferry T., Durand G., Dauwalder O., Bes M., Lina G., Vandenesch F, Etienne J.: Virulence determinants in community and hospital methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J. Hosp. Infect. 2007, 65, 105-109.
108. Varges R., Penna B., Martins G., Martins R., Lilenbaum W.: Antimicrobial susceptibility of Staphylococci isolated from naturally occurring canine external ocular diseases. Vet. Ophthalmol. 2009, 12, 216-220.
109. Waller J.R., Hodel S.L., Nuti R.N.: Improvement of two toluidine blue O-mediated techniques for DNase detection. J. Clin. Microbiol. 1985, 21, 195-199.
110. Walther B., Hermes J., Cuny C., Wieler L.H., Vincze S., Abou Elnaga Y., Stamm I., Kopp P.A., Kohn B., Witte W., Jansen A., Conraths F.J., Semmler T., Eckmanns T., Lübke-Becker A.: Sharing more than friendship--nasal colonization with coagulase-positive staphylococci (CPS) and co-habitation aspects of dogs and their owners. PLoS One. 2012, 4, e35197.
111. Wertheim H.F., Melles D.C., Vos M.C., van Leeuwen W., van Belkum A., Verbrugh H.A., Nouwen JL.: The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. Lancet Infect. Dis. 2005, 5, 751-762.
112. Wertheim H.F., van Kleef M., Vos M.C., Ott A., Verbrugh H.A., Fokkens W.: Nose picking and nasal carriage of *Staphylococcus aureus*. Infect. Control. Hosp. Epidemiol. 2006, 8, 863-867.
113. Wertheim H.F., Verveer J., Boelens H.A., van Belkum A., Verbrugh H.A., Vos M.C.: Effect of mupirocin treatment on nasal, pharyngeal, and perineal carriage of *Staphylococcus aureus* in healthy adults. Antimicrob. Agents. Chemother. 2005, 4, 1465-1467.
114. Yamasaki O., Kaneko J., Morizane S., Akiyama H., Arata J., Narita S., Chiba J., Kamio Y., Iwatsuki K.: The association between *Staphylococcus aureus* strains carrying panton-valentine leukocidin genes and the development of deep-seated follicular infection. Clin. Infect. Dis. 2005, 40, 381-385.
115. Yoon J.W., Lee K.J., Lee S.Y., Chae M.J., Park J.K., Yoo J.H., Park H.M.: Antibiotic resistance profiles of *Staphylococcus pseudintermedius* isolates from canine patients in Korea. J. Microbiol. Biotechnol. 2010, 20, 1764-1768.
116. Yoon J.W., Lee G.J., Lee S.Y., Park C, Yoo J.H., Park H.M.: Prevalence of genes for enterotoxins, toxic shock syndrome toxin 1 and exfoliative toxin among clinical isolates of *Staphylococcus pseudintermedius* from canine origin. Vet. Dermatol. 2010, 21, 484-489.
117. Youn J.H., Koo H.C., Ahn K.J., Lim S.K., Park Y.H.: Determination of staphylococcal exotoxins, SCCmec types, and genetic relatedness of *Staphylococcus intermedius* group isolates from veterinary staff, companion animals, and hospital environments in Korea. J. Vet. Sci. 2011, 12, 221-226.
118. Zegans M.E., Becker H.I., Budzik J., O'Toole G.: The role of bacterial biofilms in ocular infections. DNA Cell Biol. 2002, 21, 415-420.

8. PRACE BĘDĄCE PRZEDMIOTEM ROZPRAWY

Phage Type 187 as a Separate Subunit *Mbo*I Restriction Site Within the *Staphylococcus aureus* Species

Katarzyna Garbacz · Lidia Piechowicz

Received: 18 November 2012 / Accepted: 10 January 2013 / Published online: 30 January 2013
© Springer Science+Business Media New York 2013

Abstract The aim of this study was to use *Mbo*I restriction of *pta* gene fragment to compare the strains of *Staphylococcus aureus* phage type 187 and other phage types of *S. aureus* isolated from humans and dogs, as well as canine *S. intermedius* group strains. The study included 395 human and canine staphylococcal strains representing *S. aureus*, *S. intermedius*, and *S. pseudintermedius* species. The strains were identified with classic phenotypic methods and by the presence of species-specific thermostable nuclease (*nuc* SA) gene. All the strains were subjected to the analysis of *Mbo*I restriction site of *pta* gene fragment with PCR–RFLP method. Nearly, all human and animal strains of *S. aureus* possessed 156- and 164-bp restriction fragments. One of the human strains lacked the 320-bp amplification product. In the case of all *S. aureus* phage type 187, the amplification product of *pta* gene was insensitive to cutting with *Mbo*I restrictase. None of *S. intermedius* strains possessed restriction sites present in the product of amplification of *pta* gene, while all the strains of *S. pseudintermedius* had 213- and 107-bp restriction fragments. In conclusion, our findings regarding *S. aureus* phage type 187 reveal that within the population of strains of *S. aureus* species, these bacteria represent a group with distinct properties.

Introduction

Staphylococcus aureus phage type 187 strains occur sporadically [9] and are characterized by specific properties

described as early as in 1970 s by Live [10] and Kryński et al. [8], who postulated to classify them into a separate taxonomic unit. These staphylococci are characterized by insusceptibility to all phages of human and bovine staphylococci other than 187 phage, as well as by the cross susceptibility to the phages of canine staphylococci [7, 8]. Moreover, they show different biochemical and antigenic properties than other representatives of *S. aureus* [7, 10].

The ability to infect both humans and dogs is a particular pathogenicity trait of phage type 187 [7, 10]. Depending on the origin, this phage type shows biochemical differences on the basis of which they were previously classified as an intermediate type between human (A) and canine (E) biotypes. In 1976, the canine biotype of *S. aureus* was classified as a new species, *S. intermedius* [5]. Currently, it is classified in *S. intermedius* group, together with two other species, *S. pseudintermedius* and *S. delphini* [17]. Based on the present classification, the strains of *S. aureus* phage type 187 may be described as intermediate between *S. aureus* species and *S. intermedius* group.

A rapid and simple polymerase chain reaction–restriction fragment length polymorphism (PCR–RFLP) method, enabling the differentiation between species included in the *S. intermedius* group, was published in 2009 [1]. This method is based on *Mbo*I restriction of the *pta* gene, which encodes the enzyme phosphoacetyltransferase. *Mbo*I restriction identifies *S. pseudintermedius* species on the basis of the presence of two restriction fragments, 213 and 107 bp, which in contrast to *S. intermedius* and *S. delphini* species, are not cut by *Mbo*I. In addition, *S. aureus* strains contain a unique *Mbo*I site, resulting in restriction fragments of 156 and 164 bp, which distinguish them from strains belonging to *S. intermedius* group (SIG) [1].

The aim of this study was to use *Mbo*I restriction of *pta* gene fragment to compare the strains of *S. aureus* phage

K. Garbacz (✉)
Department of Medical Microbiology, Medical University of Gdansk, ul. Do Studzienki 38, 80-227 Gdansk, Poland
e-mail: kasgab@gumed.edu.pl

L. Piechowicz
Department of Medical Microbiology, Medical University of Gdansk, Gdansk, Poland

type 187 and other phage types of *S. aureus* isolated from humans and dogs, as well as *S. intermedius* group strains isolated from dogs.

Methods

Bacterial Strains

The study included 395 staphylococcal strains: 150 human and 17 canine strains of *S. aureus*, 4 canine strains of *S. intermedius*, 204 canine strains of *S. pseudintermedius*, and 19 strains of *S. aureus* phage type 187 isolated from humans. The 16 strains of *S. aureus* phage type 187 and all the canine strains were collected and identified as previously described [4, 15]. Three, previously not described strains of phage type 187, were isolated between October 2008 and December 2009 from three patients hospitalized in various Gdansk clinics (Clinic of Traumatology, Clinic of Intensive Therapy, Clinic of Cardiology) and originated from wound, blood, and intubation tube, respectively. In order to compare the phage type 187 with other phage types of *S. aureus*, a total of 150 staphylococci belonging to various phage groups were selected from the collection of the Center of Phage Typing of Staphylococci in Gdansk (Table 1). The reference strains were isolated from various

human clinical materials: wounds (n = 36), pus and purulent lesions (n = 28), throat (n = 21), blood (n = 9), bronchial fluid (n = 5), genital tract (n = 5), ear (n = 4), eye (n = 3), urine (n = 2), and nose swabs (n = 37) of patients/carriers.

Phenotypic Identification of Staphylococcal Isolates

Specimens were subcultured onto Columbia blood agar and incubated at 35 °C for 24 h. Suspected staphylococcal isolates were identified on the basis of colony characteristics, pigment production, Gram-stained appearance, and hemolysis. The results were confirmed by API ID 32 Staph-system (bioMerieux, Poland) used in accordance with the manufacturer's recommendations.

Phage Typing

Bacteriophage typing was performed at the Center of Phage Typing of Staphylococci in Gdansk using the international set of typing phages for human strains [13] according to the method of Blair and Williams [3]. Initially, all strains were typed at routine test dilution (RTD); strains not typeable at RTD, were typed at 100 x RTD. The strains were subdivided into phage groups according to Parker [13] and Renneberg and Rosdahl [16]: group I,

Table 1 Phage patterns of *S. aureus* strains other than phage type 187

Phage group	Phage patterns of human <i>S. aureus</i> strains	Number of strains (n = 150)	Phage patterns of canine <i>S. aureus</i> strains	Number of strains (n = 17)
Group I	52/52A	10	29/52/52A	2
	29/52	6	29/79/81	2
	80/81	2	29/52/52A/79	1
	29/52/52A/81	1	80/81	1
Group II	3C	11	3C/55/71	2
	3C/55	7	3C/55	2
	55	6	–	–
	3C/71	5	–	–
	71	3	–	–
	55/71	1	–	–
Group III	3A/3C/55	1	–	–
	6/42E/47/75/83A	3	84/85/88/89	1
	53/75/83A/84	2	–	–
	75	1	–	–
Group V	other	28	–	–
	94/96	11	94	1
Type 95	94	1	–	–
	95	15	95	1
Mixed group	I + III	10	–	–
	I + V	5	–	–
	I + II + V	2	–	2
NT		19	–	2

NT non-typeable

group II, group III, group V, type 95, mixed group (strains belonging to different lytic groups), and NT (not-typeable at 100 x RTD). The lytic pattern was determined after 18 h of incubation at 30 °C.

Detection of *nuc* Gene

In addition, all strains identified as *S. aureus* were analyzed for the presence of species-specific thermostable nuclease (*nuc SA*) gene by the method described by Baron et al. [2].

MboI Restriction Site of *pta* Gene Fragment

Genomic DNA was extracted using a commercially available kit in accordance with the manufacturer's instructions for Gram-positive bacteria (Sigma-Aldrich, Poland). PCR amplification of the 320-bp fragment of the *pta* gene was carried out as described by Bannoehr et al. [1]. 20 µl of PCR mixture was incubated with 5 U of *MboI* and 5 µl of digestion buffer for 18 h; the resultant digestion products were resolved in 2 % agarose by electrophoresis. *S. intermedius* PCM 2405 and *S. aureus* ATCC 6538P served as control strains.

Results

The phage typing of animal *S. aureus* revealed that they belonged to various phage groups, which were characterized by sequences presented in Table 1.

All analyzed human and canine strains of *S. aureus*, including those of phage type 187, carried the species-specific *nuc* gene.

Nearly all human and animal strains of *S. aureus* analyzed with PCR-RFLP method possessed 156- and 164-bp restriction fragments. One of the human strains lacked the 320-bp amplification product. In the case of all *S. aureus* phage type 187, the amplification product of *pta* gene was unsusceptible to cutting with *MboI* restrictase. None of *S. intermedius* strains possessed restriction sites present in the product of amplification of *pta* gene, while all the strains of *S. pseudintermedius* had 213- and 107-bp restriction fragments (Fig. 1).

Discussion

Staphylococcus aureus phage type 187 occurs rarely and represents only 2 % of strains isolated from humans [9, 14]. It may be isolated from both the carriers and various pathogenic lesions. Most strains analyzed in our study originated from infected sites [15].

The characteristics of phage type 187 suggest that it represents a group of strains with properties that are

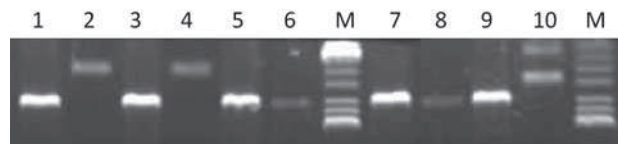


Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of *MboI* restriction digest of *pta* PCR products. *M* molecular size marker (*pUC19 DNA/MspI* enzyme; Fermentas, Lithuania); lane 1 PCR product of human *S. aureus* strains; lane 2 human *S. aureus* strains, *MboI* digested; lane 3 PCR product of canine *S. aureus* strains; lane 4 canine *S. aureus* strains, *MboI* digested; lane 5 PCR product of human *S. aureus* strains of phage type 187; lane 6 human *S. aureus* strains of phage type 187, *MboI* digested; lane 7 PCR product of canine *S. intermedius* strains; lane 8 canine *S. intermedius* strains, *MboI* digested; lane 9 PCR product of canine *S. pseudintermedius* strains; lane 10 canine *S. pseudintermedius* strains, *MboI* digested

intermediate between human and canine staphylococci. This is mostly suggested by their ability to infect humans and dogs, as well as biochemical properties that are in-between former human and canine biotypes according to Hajek and Marsalek [6]. The strains originating from canine sources are characterized by the lack of mannitol degradation, synthesis of fibrinolysin, and coagulation of human plasma, whereas the strains isolated from humans are incapable of coagulating canine plasma [7, 10]. In other cases, the strains of type 187 are characterized by simultaneous occurrence of the properties of human and canine biotype [15]. Contrary to other *S. aureus*, they are not usually able to produce urease, acetoin, and fibrinolysin [8].

Phage susceptibility of *S. aureus* type 187 is different than in typical representatives of *S. aureus*. Contrary to other staphylococci, strains of type 187 are mainly typeable with certain canine phages and also adsorb them. The susceptibility to phage 187 never coincides with the susceptibility to phages from human and bovine sets. There is lack of not only cross-typability but also of cross-adsorption [8, 10].

Antigenic differences of type 187 pertain mostly to the presence of galactosamine (instead of glucosamine) as a determinant of teichoic acid of the bacterial wall. Consequently, Oeding [12] proposed to refer to this antigen as "polysaccharide 187." Other serological differences include the presence of capsular antigens, K₁ and 17–61.218, which were not detected in any other staphylococci originating from humans [10]. Furthermore, our previous study revealed a wide prevalence of *sec* and *tst* toxin genes, which were observed not to occur as frequently in other representatives of *S. aureus* isolated from humans [15].

The identification of staphylococcal species based on *MboI* restriction gene of the *pta* fragment performed within the framework of our study, revealed absolutely surprising results. In contrast to other representatives of *S. aureus*, both human and canine, all phage type 187 staphylococci

were insusceptible to cutting with *MboI* restrictase. Although these strains originated from humans, this characteristic is typical for the canine species of *S. intermedius* rather than *S. aureus* to which they formally belong. Previous studies conducted by Bannoehr et al. [1] and Slettemeås et al. [18] revealed that *S. aureus* strains possess 156- and 164-bp restriction fragments. It can be concluded that the lack of restriction sites in phage type 187 staphylococci, different biochemical and antigenic properties, and cross susceptibility to phages used for the typing of canine staphylococci confirm that they represent a group with characteristics that are different than those possessed by other *S. aureus*. Based on these properties, phage type 187 staphylococci seem to represent an intermediate group between *S. aureus* and *S. intermedius* species. Perhaps these above-mentioned differences are associated with the possibility of alternative adaptation of type 187 staphylococci to two distinct hosts, human and canine.

Another important aspect of our study pertained to revealing that due to the presence of such strains as *S. aureus* phage type 187, the *pta/MboI* restriction fragments method may produce false results. Before the implementation of this technique, the sequencing of *sodA* and *hsp60* genes was the only method enabling distinguishing between the strains within *S. intermedius* group [17]. Since there is no phenotypic method able to accurately classify these species, the rapid and easy PCR–RFLP technique found wide application and is currently the most frequently used method of identifying species within *S. intermedius* group [11, 19, 20]. Our study confirmed that the strains of *S. aureus* and *S. intermedius* species can be misclassified using this method. Also, Slettemeås et al. [18] revealed that the PCR–RFLP method misclassified a small fraction of the *S. pseudintermedius* population. The type 187 staphylococci analyzed in our study could be potentially misclassified as *S. intermedius* or *S. delphini*, particularly in view of the fact that similarly to *S. intermedius* group staphylococci, type 187 can also be isolated from dogs.

Previous evidence regarding *S. aureus* phage type 187 and the findings of our PCR–RFLP analysis confirm that within the population of strains of *S. aureus* species, these bacteria represent a group with distinct properties. Consequently, further research is needed to verify whether they represent a distinct taxonomic unit, as has been previously postulated.

References

- Bannoehr J, Franco A, Iurescia M, Battisti A, Fitzgerald JR (2009) Molecular diagnostic identification of *Staphylococcus pseudintermedius*. *J Clin Microbiol* 47:469–471
- Baron F, Cochet MF, Pellerin JL, Ben Zakour N, Lebon A, Navarro A, Prouty I, Le Loir Y, Gautier M (2004) Development of a PCR test to differentiate *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus intermedius*. *J Food Prot* 67:2302–2305
- Blair JE, Williams RE (1961) Phage typing of staphylococci. *Bull World Health Organ* 24:771–784
- Garbacz K, Zarnowska S, Piechowicz L, Haras K (2012) Staphylococci isolated from carriage sites and infected sites of dogs as a reservoir of multidrug resistance and methicillin resistance. *Curr Microbiol*. doi:10.1007/s00284-012-0254-9
- Hajek V (1976) *Staphylococcus intermedius*, a new species isolated from animals. *J Syst Bacteriol* 26:401–408
- Hajek V, Marsalek E (1976) Evaluation of classificatory criteria for staphylococci. In: Jeliaszewicz J (ed) *Staphylococci and staphylococcal infections*. S. Karger, Hague, pp 30–37
- Kryniski S, Becla E, Pytasz Z, Malanowski J (1981) Mass carrier state of *Staphylococcus aureus* type 187 of canine origin in a neonatal ward. *Przegl Epidemiol* 35:517–520
- Kryniski S, Galiński J, Becla E (1976) Phage type 187 as a separate taxonomic subunit within the *Staphylococcus aureus* species. In: Jeliaszewicz J (ed) *Staphylococcus and Staphylococcal Diseases*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York, pp 57–62
- Krzywińska E, Piechowicz L, Galiński J (1999) Prevalence of phage group II in *Staphylococcus aureus* human strains. *Med Dośw Mikrobiol* 51:25–30
- Live I (1973) Relationship of antigen k to *Staphylococcus aureus* bacteriophage type 187, of human and of canine origins. *Infect Immun* 7:473–475
- Miedzobrodzki J, Kasprowicz A, Bialecka A, Jaworska O, Polakowska K, Wladyka B, Dubin A (2010) The first case of a *Staphylococcus pseudintermedius* infection after joint prosthesis implantation in a dog. *Pol J Microbiol* 59:133–135
- Oeding P (1974) Cellular antigens of staphylococci. *Ann N Y Acad Sci* 236:15–21
- Parker MT (1983) The significance of phage-typing patterns in *Staphylococcus aureus*. In: Easmon CSF, Adlam C (eds) *Staphylococci and staphylococcal disease*, vol 1. Academic Press, London, pp 33–62
- Piechowicz L, Galinski J, Dajnowska-Stanczewska A, Garbacz K (2005) Phage types of *Staphylococcus aureus* isolated in Poland in 1999–2004. *Med Dosw Mikrobiol* 57:105–113
- Piechowicz L, Garbacz K, Galinski J (2008) *Staphylococcus aureus* of phage type 187 isolated from people occurred to be a genes carrier of enterotoxin C and toxic shock syndrome toxin-1 (TSST-1). *Int J Hyg Environ Health* 211:273–282
- Renneberg J, Rosdahl VT (1992) Epidemiological studies of penicillin resistance in Danish *Staphylococcus aureus* strains in the period 1977–1990. *Scand J Infect Dis* 24:401–409
- Sasaki T, Kikuchi K, Tanaka Y, Takahashi N, Kamata S, Hiramatsu K (2007) Reclassification of phenotypically identified *Staphylococcus intermedius* strains. *J Clin Microbiol* 45:2770–2778
- Slettemeås JS, Mikalsen J, Sunde M (2010) Further diversity of the *Staphylococcus intermedius* group and heterogeneity in the *MboI* restriction site used for *Staphylococcus pseudintermedius* species identification. *J Vet Diagn Invest* 5:756–759
- Yoon JW, Lee KJ, Lee SY, Chae MJ, Park JK, Yoo JH, Park HM (2010) Antibiotic resistance profiles of *Staphylococcus pseudintermedius* isolates from canine patients in Korea. *J Microbiol Biotechnol* 20:1764–1768
- Youn JH, Koo HC, Ahn KJ, Lim SK, Park YH (2011) Determination of staphylococcal exotoxins, SCCmec types, and genetic relatedness of *Staphylococcus intermedius* group isolates from veterinary staff, companion animals, and hospital environments in Korea. *J Vet Sci* 12:221–226

Pathogenicity potential of *Staphylococcus pseudintermedius* strains isolated from canine carriers and from dogs with infection signs

Katarzyna Garbacz,^{1,*} Sabina Żarnowska,² Lidia Piechowicz¹ and Krystyna Haras¹

¹Department of Medical Microbiology; Medical University of Gdansk; Gdansk, Poland; ²Private Veterinary Practice; Gdansk, Poland

Keywords: biofilm, canine infection, pathogenicity, protein A, *Staphylococcus pseudintermedius*, toxin, virulence

The aim of this study was to compare the pathogenicity potential of *Staphylococcus pseudintermedius* strains isolated from healthy dogs and dogs with evident symptoms of infection. Nearly all examined strains synthesized β -hemolysin, clumping factor, coagulase, DNase, protein A, and lipase. The only statistically significant intergroup difference pertained to protein A, synthesized more frequently in infected dogs. All strains were positive for *siet* and *lukS/F* genes. No *sea*, *seb*, *sed*, *see* and *tst* genes were detected. The *sec* gene was detected in 1/71 (1.4%) strains obtained from a healthy dog and in 2/120 (1.6%) strains from infected animals. The subsequent DNA sequencing analysis revealed that the amplified *sec* genes in all the *S. pseudintermedius* isolates were sub-grouped into the type SEC_{canine}.

In 1976, V. Hajek identified a new species, *Staphylococcus intermedius*, within animal biotype of *S. aureus* (E and F), based on its biochemical properties and G+C content.¹ This species was considered a predominant cause of canine infections until 2005 when Devriese et al.² identified another new species, *S. pseudintermedius*, based on the sequential analysis of 16S rRNA. In 2007, sequential analysis of *sodA* and *hsp60* genes confirmed close relatedness of three species, *S. intermedius*, *S. pseudintermedius* and *S. delphini*, which are currently referred to as the *S. intermedius* group.³ Recent studies confirmed that *S. pseudintermedius*, corresponding to previous *S. intermedius* species, is the most commonly isolated canine staphylococcus.⁴ *S. pseudintermedius* can be obtained from the nose, oral mucosa, anus, groin,

and skin of healthy dogs. Moreover, it often leads to opportunistic purulent dermatitis, otitis externa and conjunctivitis.^{4,5}

Similarly to *S. aureus*, *S. pseudintermedius* synthesizes an array of invasion and virulence factors. These include factors enabling adhesion to host's cells or extracellular matrix (clumping factor and biofilm), toxins, and factors modulating host's immune system (hemolysins, leukotoxin, exfoliative toxins and enterotoxins). Another group includes factors enabling the microorganism to spread within host's body, such as coagulase, DNase, protein A or lipases.⁶

However, our knowledge on the pathogenesis of *S. pseudintermedius* is very limited; to date, the majority of virulence factors have not been characterized in detail. Consequently, the aim of this study was to compare the pathogenicity potential of *S. pseudintermedius* isolated from healthy dogs with no history of any infection-related symptoms for at least one year preceding the study, to that obtained from dogs with evident symptoms of infection.

The study included 71 isolates of *S. pseudintermedius* obtained from healthy dogs and 120 *S. pseudintermedius* isolates from diseased dogs. The strains were obtained from 369 dogs of both genders from ten veterinary practices, between February 2008 and December 2011, in four cities of Northern Poland (Gdansk, Gdynia, L bork and Pruszcz Gdanski). The study included 172 completely healthy dogs with no history of any infection-related symptoms for at least one year prior to sampling. Three swabs were taken from each dog from this group.

One cotton-tipped culture swab was taken from one anterior nostril, the second from the mouth, and the third from the perineal region. Additionally, samples from 197 diseased dogs were obtained by swabbing diseased sites with a sterile cotton swab or by urinary bladder catheterization in the case of cystitis. The samples were taken only from dogs with evident symptoms of infection: dermatitis (superficial pyodermitis, abscess, and deep pyodermitis, n = 109), external otitis (n = 31), conjunctivitis (n = 18), vaginitis (n = 12), rhinitis (n = 11), pharyngitis (n = 10) and cystitis (n = 6). In order to avoid duplication of results, only one isolate was considered if various isolates belonged to the same species and characterized by similar susceptibility were obtained from a particular dog. The examined strains were preserved with Tryptic Soy Bullion (TSB) and 15% glycerol at a temperature of -70°C.

Specimens were subcultured onto Columbia blood agar and incubated at 35°C for 24 h. Suspected staphylococcal isolates were identified on the basis of colony characteristics, Gram-stained appearance, and hemolysis. For the identification of *S. pseudintermedius* species, polymerase chain reaction – restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) method was used. This method is based on MboI restriction gene of the *pta* fragment.⁷

The abilities to synthesize β -hemolysin, coagulase and clumping factor (CF) were tested as previously described.⁸ DNase activity was detected by flooding DNase test agar with toluidine blue O (Merck).⁹ Lypolytic properties of examined strains

*Correspondence to: Katarzyna Garbacz; Email: ksgab@gumed.edu.pl
Submitted: 11/20/12; Revised: 01/06/13; Accepted: 01/07/13
<http://dx.doi.org/10.4161/viru.23526>

Table 1. Primer sequences and thermal conditions of PCR analysis

Gene	Oligonucleotide sequence (5'-3')	Temperature of annealing	Size of PCR product (bp)	Reference
<i>Pta</i>	AAA GAC AAA CTT TCA GGT AA GCA TAA ACA AGC ATT GTA CCG	53°C	320	Bannoehr et al. ⁷
<i>Sea</i>	CCT TTG GAA ACG GTT AAA ACG TCT GAA CCT TCC CAT CAA AAA C	55°C	127	Becker et al. ¹⁵
<i>Seb</i>	TCG CAT CAA ACT GAC AAA CG GCA GGT ACT CTA TAA GTG CCT GC	55°C	477	Becker et al. ¹⁵
<i>Sec</i>	CTC AAG AAC TAG ACA TAA AAG CTA GG TCA AAA TCG GAT TAA CAT TAT CC	55°C	271	Becker et al. ¹⁵
<i>Sed</i>	CTA GTT TGG TAA TAT CTC CTT TAA ACG TTA ATG CTA TAT CTT ATA GGG TAA ACA TC	55°C	319	Becker et al. ¹⁵
<i>See</i>	CAG TAC CTA TAG ATA AAG TTA AAA CAA GC TAA CTT ACC GTG GAC CCT TC	55°C	178	Becker et al. ¹⁵
<i>Tst</i>	AAG CCC TTT GTT GCT TGC G ATC GAA CTT TGG CCC ATA CTT T	55°C	445	Becker et al. ¹⁵
<i>Siet</i>	ATG GAA AAT TTA GCG GCA TCT GG CCA TTA CTT TTC GCT TGT TGT GC	56°C	359	Lautz et al. ¹⁴
<i>lukS</i>	TGT AAG CAG CAG AAA ATG GGG GCC CGA TAG GAC TTC TTA CAA	57°C	503	Futagawa-Saito et al. ¹³
<i>lukF</i>	CCT GTC TAT GCC GCT AAT CAA AGG TCA TGG AAG CTA TCT CGA	57°C	572	Futagawa-Saito et al. ¹³

were tested in TSA medium (Difco) with 1% Tween 80 and 0.1% CaCl₂ (Serva).¹⁰

Protein A was estimated with the dot blot method. Namely, 10 µL of overnight broth cultures were spotted onto nitrocellulose (Schleicher and Schuell) sheets and air-dried. Non-specific binding sites were blocked with 3% bovine serum albumin (Serva) in PBS for 1 h at room temperature; next, peroxidase-conjugated rabbit anti-human IgG (DAKO) was added to a concentration of 1/1,000 for another hour. After washing in PBS and in TBS (10 mM, pH 7.4), the sheet was immersed in freshly prepared 4-chloronaphthol reagent to develop the color. The amount of color was assumed to be dependent on the binding of gamma globulin by protein A.¹¹ *S. aureus* Cowan I strain served as positive control strain.

Detection of enterotoxins (*sea*, *seb*, *sec*, *sed* and *see*) and *tst* (toxic shock syndrome toxin) genes was performed as described previously.¹² The amplification of *lukS/F* (leukotoxin) and *siet* (exfoliative toxin) genes was performed according to Futagawa-Saito et al.¹³ and Lautz et al.¹⁴ respectively (Table 1). DNA amplification was performed in a Perkin Elmer 2400 thermocycler (Norwalk). The PCR

products were analyzed on 2% agarose gel (Sigma) in the presence of ethidium bromide.

For sequencing the 271-bp *sec*, amplicons of the three *S. pseudintermedius* strains were purified by gel filtration (Centri-Sep columns, Princeton Separations). The sequencing was performed by DNA sequencer (PerkinElmer Corp.). The investigated sequences were compared with *sec*_{canine} and *sec*₁₋₃ sequences.¹⁵

The ability of the isolates to form biofilm was investigated by a method described by Stapanovic et al.¹⁶ with some modifications. Bacteria were cultivated overnight in TBS (Gras). Each culture was diluted 1:100 in the same medium and, subsequently, 200 µL of the diluted bacterial suspension was transferred, in triplicates, into the wells of sterile 96-well polystyrene microtiter plates (Becton Dickinson) and incubated at 37°C for 24 h. The negative control contained only the growth medium. The plates were washed twice with 200 µL of PBS (pH 7.2) and dried at room temperature prior to adding 1% Hucker crystal violet solution. The plates were incubated at room temperature for 15 min before excess dye was removed by washing with water. The bound dye was

dissolved in 150 µL of 95% ethanol. The absorbance of the adherent biofilm at 570 nm (OD₅₇₀) was measured in a microplate reader. For each isolate, the result was calculated by subtracting the median OD₅₇₀ of the triplicates of the negative control from the median OD₅₇₀ of the triplicates of the samples. Three independent experiments were performed and the mean of the three experiments was calculated based on the median from each experiment. Based on the OD produced by bacterial films, strains were classified into the following categories: no biofilm producers (OD ≤ ODc), weak biofilm producers (ODc < OD ≤ 2 × ODc), moderate (2 × ODc < OD ≤ 4 × ODc) and strong biofilm producers (4 × ODc < OD), as proposed by Stapanovic et al.¹⁶ The cutoff OD (ODc) was defined as three standard deviations above the mean OD of the negative control.

The fractions of staphylococcal isolates were presented as number and percentage distributions and compared among the studied groups of dogs with Pearson's chi-square test and Fischer's exact test. All calculations were performed with the Statistica 10 (StatSoft®) package, with the level of significance set at p ≤ 0.05.

Table 2. Expression of phenotypic pathogenicity factors in *S. pseudintermedius* isolates

Source	Beta-hemolysin	Clumping factor	Coagulase	DNase	Protein A	Lipase
Healthy dogs (n = 71)	70 (98.6%)	10 (14.1%)	66 (92.9%)	71 (100%)	1 (1.4%)	70 (98.6%)
Infected dogs (n = 120)	118 (98.3%)	23 (19.2%)	116 (96.6%)	120 (100%)	17 (14.2%)	117 (97.5%)
p	0.890	0.396	0.242	-	0.004	0.611

Position 571-670 (U91526)					
<i>S. pseudintermedius</i> isolate 1	AGTAACGACA	ATACTTTTTG	GTATGATATG	ATGCCTGCAC	CAGGCGATAA
<i>S. pseudintermedius</i> isolate 2
<i>S. pseudintermedius</i> isolate 3
<i>sec</i> _{canine}
<i>sec</i> ₁₋₃	. A G
<i>S. pseudintermedius</i> isolate 1	GTTTGACCAA	TCTAAATACT	TAATGATATA	CAGCGACAAT	AAAACGGTTG
<i>S. pseudintermedius</i> isolate 2
<i>S. pseudintermedius</i> isolate 3
<i>sec</i> _{canine}
<i>sec</i> ₁₋₃ T G A

Figure 1. Alignment of DNA sequences for *sec* genes of three investigated isolates of *S. pseudintermedius* and reference sequences of *S. intermedium* canine subtype, and *S. aureus sec* 1–3 subtype. The EMBL accession numbers of the *sec* nucleotide sequences used for the alignment are as follows: *sec*_{canine}, U91526; *sec*₁, X05815; *sec*₂, DQ192646; *sec*₃, X51661. The sequences of the three *S. aureus* subtypes were merged, since there were not differences in the aligned region as showed here. Dots indicate identity.

Both *S. pseudintermedius* strains isolated from healthy dogs and those obtained from infected dogs synthesized β -hemolysin, CF, coagulase, DNase, protein A and lipase. The only statistically significant intergroup difference pertained to protein A (Table 2).

All isolates were positive for *siet* and *lukSIF* genes. No *sea*, *seb*, *sed*, *see* and *tst* genes were detected. The *sec* gene was detected in 1/71 (1.4%) strains obtained from a healthy dog and in 2/120 (1.6%) strains from infected animals ($p = 0.689$). The subsequent DNA sequencing analysis revealed that the amplified *sec* genes in all the *S. pseudintermedius* isolates were sub-grouped into the type SEC_{canine} (Fig. 1).

No significant differences with regards to biofilm formation were documented between the strains isolated from healthy and infected dogs; most of these strains synthesized medium or high amounts of biofilm (Table 3). All strains isolated from conjunctivitis synthesized large amounts of biofilm. No association between the isolation site and the intensity of biofilm synthesis was observed for the strains isolated from other clinical materials.

Analysis of the prevalence of phenotypic virulence factors among the examined isolates of *S. pseudintermedius* revealed that nearly all of them were characterized by the presence of β -hemolysin,

Table 3. Formation of biofilm by *S. pseudintermedius* isolates

Formation of biofilm	Healthy dogs (n = 71)	Infected dogs (n = 120)	p
No biofilm producer	0	0	-
Weak biofilm producer	3 (4.2%)	8 (6.6%)	0.484
Moderate biofilm producer	45 (63.4%)	63 (52.5%)	0.143
Strong biofilm producer	23 (32.4%)	49 (40.8%)	0.245

coagulase, DNase and lipase. The presence of these factors is consistent with the characteristic of new *S. pseudintermedius* species, published by Devriese et al.² According to this description, *S. pseudintermedius* strains are CF-negative. In contrast, our study revealed that nearly 20% of isolates are CF-positive. On the other hand, Futagawa-Saito et al.¹⁷ analyzed strains of *S. intermedium* group and revealed that more than half of them were CF-positive. Plausibly, the discrepancies can result from insufficient evidence with regards to the pathogenicity of newly established species *S. pseudintermedius*; further research is required in this matter.

Staphylococcal protein A is a wall-anchored surface protein with four or five domains that can each bind to the Fc region of IgG. The interaction between protein A and IgG coats the surface of the cell with IgG molecules that cannot be recognized by the neutrophil Fc receptor and activate the complement by the classical pathway as a result of incorrect

orientation. This explains the anti-phagocytic effect of protein A in vitro and the reason for constituting a virulence factor in several models of animal infection.¹⁸ Protein A is encoded by *spa* gene, located on chromosome. Despite wide utilization of the polymorphism of this gene for epidemiological studies of staphylococci, including *S. pseudintermedius*,⁵ the synthesis of protein A has not been studied in *S. pseudintermedius* isolates thus far. Futagawa-Saito et al.¹⁷ were the only ones to observe that 54.5% of canine *S. intermedium* strains show the expression of protein A and CF on latex agglutination test. Our study is the first to examine the expression of protein A by means of dot blot in a large number of canine strains. We have unambiguously confirmed that the strains from infected dogs synthesize protein A markedly more frequently than those from healthy dogs. Protein A was the only phenotypic pathogenicity factor that distinguished infected and non-infected dogs. This finding is not surprising in

view of the evidence that protein A is a significant and established pathogenicity factor of *S. aureus*.¹⁸ Our findings suggest that the same pertains to the newly established *S. pseudintermedius* species.

Panton-Valentine leukocidin of *S. aureus* is a cytotoxin that causes leukocyte destruction and tissue necrosis. A similar toxin, biocomponent leukotoxin Luk-I, encoded by two genes, *lukS/F*, is also produced by *S. pseudintermedius*.¹⁷ All strains analyzed in our study, both from healthy and infected dogs, had both leukotoxin genes, *lukS/F*. Also, in research published by other authors all analyzed clones were positive for leukotoxin genes, suggesting clone-specific ability of toxin synthesis.^{5,13} However, in view of our findings, the determination of given pathogenicity of *S. pseudintermedius* based on the presence of *lukS/F* genes seems less unambiguous.

All strains of *S. pseudintermedius* included in our study, isolated from both healthy and infected dogs, possessed exfoliative toxin genes. *S. pseudintermedius* exfoliative toxin (SIET), first described by Terauchi et al.,¹⁹ plays a potential role in the pathogenesis of canine pyoderma and chronic otitis.¹⁹ The dog injected with SIET developed clinical signs such as erythema, exfoliation, and crusting, which are similar to symptoms seen in canine pyoderma and human staphylococcal scaled skin syndrome.¹⁹ However, similarly to our study, a number of other authors confirmed the presence of *siet* gene in all analyzed strains rather than only in those isolated from skin lesions.^{5,14,20} Our study adds to this evidence, revealing that this gene is present in all *S. pseudintermedius*, even those isolated from healthy dogs. The role of SIET in pathogenicity of the species in question is even more unclear since, in a recent study, the intradermal injection of recombinant SIET in three dogs did not cause any clinically- or histopathologically evident lesions.⁶

Superantigens are a class of antigens that cause non-specific activation of T cells resulting in polyclonal T cell proliferation and massive cytokine release. Staphylococcal superantigens include enterotoxins, responsible for the signs of food poisoning, as well as the toxic shock syndrome toxin (TSST-1). Similar to previous studies,²⁰⁻²² our study analyzing

the presence of genes encoding the most important enterotoxins A-E (SEA-SEE) and TSST-1, revealed solely the *sec* gene. In previous studies, the prevalence of *sec* ranged between 24.3%²⁰ and 0.6%;²¹ this gene was identified in 1.6% of all dogs included in our study. Edwards et al.²³ have identified a canine type SEC from canine pyoderma isolates, distinct from other staphylococcal enterotoxins, but sharing their ability to induce vomiting and T cell proliferation. Our DNA sequencing analysis revealed that the amplified *sec* genes in all the *S. pseudintermedius* isolates represented SEC_{canine} type, which confirmed their enteropathogenic potential.

Staphylococci form biofilm on the surface of host's tissues as well as on abiotic surfaces, where bacterial cells are immersed within polysaccharide excretion of amorphous mucus. Biofilm promotes the survival of bacteria, protecting them against physicochemical factors and immune mechanisms of the host. As a result of biofilm fragmentation and detachment, the bacteria spread throughout the body and colonize new sites, leading to the chronic and recurrent character of resultant infection. Bacteria that are immersed in biofilm show higher resistance to antibiotics, whose effective concentrations have to be many times higher than in the case of planktonic cells.²⁴ While the synthesis of biofilm by various strains of *S. aureus* and *S. epidermidis* has been quite extensively studied, only sparse studies have dealt with the problem in question in staphylococci isolated from dogs.²⁵ We tested a large number of *S. pseudintermedius* isolates for their biofilm formability. The method of microtiter plates used in this study is one of the most frequently applied screening methods, and is considered both reliable and sensitive. Our study revealed that the majority of *S. pseudintermedius* strains generated moderate or large amounts of biofilm. However, there were no statistically significant differences in this matter between the strains obtained from healthy and infected dogs. An important finding of our study is the observation that all strains isolated from conjunctivitis cases synthesized large amounts of biofilm. *S. intermedium* group is one of the most frequently encountered staphylococcal species in the conjunctival

sac of clinically normal dogs as well as in dogs with ulcerative keratitis.^{26,27} Previous studies confirmed that biofilm plays an undisputable role in various ophthalmic infections in humans, including staphylococcal infections.²⁴ However, to the best of our knowledge this study is the first to document the synthesis of large amounts of biofilm by *S. pseudintermedius* strains isolated from canine conjunctivitis. Previous studies revealed that bacterial biofilms may participate in ocular infections by allowing bacteria to persist on abiotic surfaces that come in contact with, or are implanted, in the eye and by direct biofilm formation on the biotic surface of the eye.²⁴ Since the abiotic surfaces were not found in any dogs with conjunctivitis included in our study, it can be supposed that the enhanced synthesis of biofilm by studied *S. pseudintermedius* strains could play a role in the course of ocular inflammation in vivo.

In conclusion, our comparative analysis of pathogenicity factors of *S. pseudintermedius* has shown that infected and healthy dogs differed significantly in terms of protein A formation; this suggests that this protein may potentially play a role in the pathogenicity of *S. pseudintermedius*. Moreover, we have documented for the first time that *S. pseudintermedius* strains isolated from canine conjunctivitis are able to synthesize large amounts of biofilm.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

References

- Hajek V. *Staphylococcus intermedium*, a new species isolated from animals. *Int J Syst Bacteriol* 1976; 26:401-8; <http://dx.doi.org/10.1099/00207713-26-4-401>.
- Devriese LA, Vancanneyt M, Baele M, Vanechoutte M, De Graef E, Snauwaert C, et al. *Staphylococcus pseudintermedius* sp. nov., a coagulase-positive species from animals. *Int J Syst Evol Microbiol* 2005; 55:1569-73; PMID:16014483; <http://dx.doi.org/10.1099/ijs.0.63413-0>.
- Sasaki T, Kikuchi K, Tanaka Y, Takahashi N, Kamata S, Hiramatsu K. Reclassification of phenotypically identified *staphylococcus intermedium* strains. *J Clin Microbiol* 2007; 45:2770-8; PMID:17596353; <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00360-07>.
- Garbacz K, Zarnowska S, Piechowicz L, Haras K. Staphylococci isolated from carriage sites and infected sites of dogs as a reservoir of multidrug resistance and methicillin resistance. *Curr Microbiol* 2012; In press; PMID:23099429; <http://dx.doi.org/10.1007/s00284-012-0254-9>.

5. Ruscher C, Lübke-Becker A, Semmler T, Wleklinski CG, Paasch A, Soba A, et al. Widespread rapid emergence of a distinct methicillin- and multidrug-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* (MRSP) genetic lineage in Europe. *Vet Microbiol* 2010; 144:340-6; PMID:20181441; <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.01.008>.
6. Bannoehr J, Guardabassi L. *Staphylococcus pseudintermedius* in the dog: taxonomy, diagnostics, ecology, epidemiology and pathogenicity. *Vet Dermatol* 2012; 23:253-66, e51-2; PMID:22515504; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3164.2012.01046.x>.
7. Bannoehr J, Franco A, Iurescia M, Battisti A, Fitzgerald JR. Molecular diagnostic identification of *Staphylococcus pseudintermedius*. *J Clin Microbiol* 2009; 47:469-71; PMID:19091817; <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.01915-08>.
8. Devriese LA. A simplified system for biotyping *Staphylococcus aureus* strains isolated from animal species. *J Appl Bacteriol* 1984; 56:215-20; PMID:6373707; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.1984.tb01341.x>.
9. Waller JR, Hodel SL, Nuti RN. Improvement of two toluidine blue O-mediated techniques for DNase detection. *J Clin Microbiol* 1985; 21:195-9; PMID:3972986.
10. Sierra G. A simple method for the detection of lipolytic activity of micro-organisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. *Antonie Van Leeuwenhoek* 1957; 23:15-22; PMID:13425509; <http://dx.doi.org/10.1007/BF02545855>.
11. Kerr S, Kerr GE, Mackintosh CA, Marples RR. A survey of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* affecting patients in England and Wales. *J Hosp Infect* 1990; 16:35-48; PMID:1974905; [http://dx.doi.org/10.1016/0195-6701\(90\)90047-R](http://dx.doi.org/10.1016/0195-6701(90)90047-R).
12. Becker K, Roth R, Peters G. Rapid and specific detection of toxigenic *Staphylococcus aureus*: use of two multiplex PCR enzyme immunoassays for amplification and hybridization of staphylococcal enterotoxin genes, exfoliative toxin genes, and toxic shock syndrome toxin 1 gene. *J Clin Microbiol* 1998; 36:2548-53; PMID:9705390.
13. Futagawa-Saito K, Sugiyama T, Karube S, Sakurai N, Ba-Thein W, Fukuyasu T. Prevalence and characterization of leukotoxin-producing *Staphylococcus intermedius* in Isolates from dogs and pigeons. *J Clin Microbiol* 2004; 42:5324-6; PMID:15528733; <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.42.11.5324-5326.2004>.
14. Lautz S, Kanbar T, Alber J, Lämmler C, Weiss R, Prenger-Berninghoff E, et al. Dissemination of the gene encoding exfoliative toxin of *Staphylococcus intermedius* among strains isolated from dogs during routine microbiological diagnostics. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 2006; 53:434-8; PMID:17062121; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0450.2006.00999.x>.
15. Becker K, Keller B, von Eiff C, Brück M, Lubritz G, Etienne J, et al. Enterotoxigenic potential of *Staphylococcus intermedius*. *Appl Environ Microbiol* 2001; 67:5551-7; PMID:11722906; <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.67.12.5551-5557.2001>.
16. Stepanovic S, Vukovic D, Hola V, Di Bonaventura G, Djukic S, Cirkovic I, et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS* 2007; 115:891-9; PMID:17696944; http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0463.2007.apm_630.x.
17. Futagawa-Saito K, Ba-Thein W, Sakurai N, Fukuyasu T. Prevalence of virulence factors in *Staphylococcus intermedius* isolates from dogs and pigeons. *BMC Vet Res* 2006; 2:4; PMID:16438708; <http://dx.doi.org/10.1186/1746-6148-2-4>.
18. Palmqvist N, Foster T, Tarkowski A, Josefsson E. Protein A is a virulence factor in *Staphylococcus aureus* arthritis and septic death. *Microb Pathog* 2002; 33:239-49; PMID:12473438; <http://dx.doi.org/10.1006/mpat.2002.0533>.
19. Terauchi R, Sato H, Hasegawa T, Yamaguchi T, Aizawa C, Maehara N. Isolation of exfoliative toxin from *Staphylococcus intermedius* and its local toxicity in dogs. *Vet Microbiol* 2003; 94:19-29; PMID:12742712; [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-1135\(03\)00048-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-1135(03)00048-8).
20. Yoon JW, Lee KJ, Lee SY, Chae MJ, Park JK, Yoo JH, et al. Antibiotic resistance profiles of *Staphylococcus pseudintermedius* isolates from canine patients in Korea. *J Microbiol Biotechnol* 2010; 20:1764-8; PMID:21193835.
21. Futagawa-Saito K, Suzuki M, Ohsawa M, Ohshima S, Sakurai N, Ba-Thein W, et al. Identification and prevalence of an enterotoxin-related gene, *set*, in *Staphylococcus intermedius* isolates from dogs and pigeons. *J Appl Microbiol* 2004; 96:1361-6; PMID:15139930; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02264.x>.
22. Youn JH, Koo HC, Ahn KJ, Lim SK, Park YH. Determination of staphylococcal exotoxins, SCCmec types, and genetic relatedness of *Staphylococcus intermedius* group isolates from veterinary staff, companion animals, and hospital environments in Korea. *J Vet Sci* 2011; 12:221-6; PMID:21897094; <http://dx.doi.org/10.4142/jvs.2011.12.3.221>.
23. Edwards VM, Deringer JR, Callantine SD, Deobald CF, Berger PH, Kapur V, et al. Characterization of the canine type C enterotoxin produced by *Staphylococcus intermedius* pyoderma isolates. *Infect Immun* 1997; 65:2346-52; PMID:9169773.
24. Zegans ME, Becker HI, Budzik J, O'Toole G. The role of bacterial biofilms in ocular infections. *DNA Cell Biol* 2002; 21:415-20; PMID:12167244; <http://dx.doi.org/10.1089/10445490260099700>.
25. Osland AM, Vestby LK, Fanuelson H, Slettemeås JS, Sunde M. Clonal diversity and biofilm-forming ability of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*. *J Antimicrob Chemother* 2012; 67:841-8; PMID:22258925; <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkr576>.
26. Prado MR, Rocha MF, Brito EH, Girão MD, Monteiro AJ, Teixeira MF, et al. Survey of bacterial microorganisms in the conjunctival sac of clinically normal dogs and dogs with ulcerative keratitis in Fortaleza, Ceará, Brazil. *Vet Ophthalmol* 2005; 8:33-7; PMID:15644098; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1463-5224.2005.04061.x>.
27. Vargas R, Penna B, Martins G, Martins R, Lilenbaum W. Antimicrobial susceptibility of Staphylococci isolated from naturally occurring canine external ocular diseases. *Vet Ophthalmol* 2009; 12:216-20; PMID:19604336; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1463-5224.2009.00701.x>.

Katarzyna GARBACZ¹
 Lidia PIECHOWICZ¹
 Wioletta BARAŃSKA-RYBAK²
 Maria DĄBROWSKA-SZPONAR¹

¹ Department of Medical Microbiology,
 Medical University of Gdańsk,
 Poland

² Department of Dermatology,
 Venereology and Allergology,
 Medical University of Gdańsk,
 ul. Do Studzienki 38, 80-227 Gdańsk,
 Poland

Reprints: K. Garbacz
 <kasgab@amg.gda.pl>

Staphylococcus aureus isolated from patients with recurrent furunculosis carrying Panton-Valentine leukocidin genes represent *agr* specificity group IV

Recurrent furunculosis (RF) caused by *Staphylococcus aureus* presents a difficult clinical problem and causes significant morbidity. The study aim was to characterise *agr* groups and detect toxin genes among *S. aureus* strains isolated from RF patients. Microbiological material was obtained from evacuated furuncles of 44 RF patients. Nasal swabs were obtained from both the RF patients and the controls (150 healthy volunteers with no history of RF). All strains were screened for the presence of *lukS/lukF-PV*, *tst*, *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *eta*, and *etb* genes. Moreover, *agr* specificity groups (I-IV) were identified. Antibiotic-susceptibility tests were performed by disk diffusion method and methicillin susceptibility was verified by *mecA* gene amplification. The investigated strains were resistant to penicillin, clindamycin, erythromycin, and tetracycline. All showed susceptibility to methicillin. Thirty-five of 44 strains tested were positive for leukocidin *lukS/lukF-PV* genes and 12/44 for enterotoxin *seb* gene. The coexistence of PVL genes and *seb* gene concerned 7/44 strains. The remaining toxin genes were not found. Forty-three strains belonged to *agr* specificity group IV including all strains with *lukS/lukF-PV* genes. Nasal carriage of *S. aureus* was observed in 27/44 (61.3%) RF patients and in 43/150 (28.6%) controls ($p=0.001$). In all RF subjects, nasal strains did not differ from those isolated from furuncles in terms of *lukS/lukF-PV* gene status and *agr* specificity. To the best of our knowledge, it is the first study that shown such a predominance of *agr* group IV strains in RF patients.

Key words: *Staphylococcus aureus*, recurrent furunculosis, *agr* group, Panton-Valentine leukocidin

Article accepted on 10/7/2010

Furuncles are acute, usually necrotic infections of hair follicles caused by *Staphylococcus aureus*. Furunculosis is diagnosed when multiple furuncles at different stages of development are found on the patient [1]. The clinical presentation varies greatly, from small follicular nodules to large nodules with varying degrees of erythema, swelling, and central necrosis [2]. The infection tends to be recurrent in many patients and often spreads to other family members [3]. Recurrent furunculosis (RF) constitutes a difficult clinical problem because it may require incision, drainage and antibiotic therapy [4]. The tendency for certain individuals to develop RF is not fully understood [5].

The pathogenicity of *S. aureus* is associated with the production of a number of extracellular toxins, enzymes and cell-surface-associated proteins. The expression of most of these virulence factors is controlled by the locus *agr* (accessory gene regulator). Based on the polymorphism of *agrC* and *agrD* genes, *S. aureus* strains may be divided into four major groups (I-IV) [6]. Associations between a peculiar *agr* type and specific staphylococcal syndromes have been

shown for toxic shock syndrome (TSS) and staphylococcal scalded-skin syndrome (SSSS). Toxic shock syndrome toxin-1 (TSST-1) produces isolates belonging to *agr* specificity group III, whereas most exfoliatin-producing strains responsible for SSSS belong to the *agr* group IV [7, 8]. The aim of the study was to characterise *agr* groups and detect toxin genes among *S. aureus* strains isolated from patients with recurrent furunculosis.

Materials and methods

Bacterial strains

Forty-four patients suffering from RF, reporting to four dermatological clinics within the city of Gdańsk (Poland) between 2004 and 2005, were included in the study. The control group comprised 150 healthy volunteers with no history of RF. These were students of the Medical University of Gdańsk, examined during their 2008/2009 classes at the Department of Medical Microbiology. Microbiological

material was obtained from evacuated furuncles and the swabs were inoculated directly onto 5% sheep blood agar (Oxoid, England). One strain of *S. aureus* was isolated from every subject. Additionally, for the purpose of *S. aureus* carrier state identification, nasal swabs were obtained both from RF patients and from the controls. *S. aureus* identification was performed on the basis of colony morphology, Gram staining, Staphyslide agglutination test (BioMerieux, France) and by the API ID32Staph system (BioMerieux, France). Control strains for PCR detection of genes of virulence factors and *agr* groups were obtained from the National Institute of Public Health (NIPH, Warsaw, Poland) and from the National Staphylococcus Reference Centre (Gdańsk, Poland). Both the control and examined strains were stored in Tryptic Soy Broth (Oxoid, England) at -70°C and supplemented with 15% glycerol.

Toxin gene detection by PCR technique

DNA was isolated according to Barski *et al.* [9]. DNA amplification was carried out in Perkin Elmer 2400 thermocycler (Norwalk, USA). Primers for enterotoxins (SEA, SEB, SEC and SED), TSST-1 and exfoliative toxins (ETA, ETB) were used as described previously [10]. Bacterial DNA (50-100 ng) of *S. aureus* isolates was amplified in two sets of multiplex PCR. Set A contained 20 pmol (each) of *sea*, *seb*, and *sec* primers and 40 pmol of *sed* primer, while set B contained 50 pmol of *eta* and 20 pmol (each) of *etb*, and *tst* primers. Detection of the genes was performed in 50 μL of a mixture consisting of: 5 μL bacterial DNA (5 ng/ μL), 5 μL 10X Reaction Buffer (Fermentas, Germany), primers *sea*, *seb*, *sec*, *sed* or *eta*, *etb* and *tst* (Sigma-Proligo, USA), 200 μM (each) dNTP, 2.5 U of Taq polymerase (Fermentas, Germany) and sterile water. DNA amplification was carried out with the following thermal cycling profile: an initial denaturation at 94°C for 5 min was followed by 35 cycles of amplification (denaturation at 94°C for 2 min, annealing at 57°C for 2 min, and extension at 72°C for 1 min) and a final extension at 72°C for 7 min. The amplification of PVL genes (*lukS/lukF-PV*) was performed as described by Lina *et al.* [11]. *Agr* specificity groups were identified by PCR amplification of the hyper-variable domain according to Shopsin *et al.* [12]. The PCR products were analysed on 2% agarose gel (Sigma, USA) in the presence of ethidium bromide and photographed under UV illumination.

Antimicrobial susceptibility test

The antibiotic-susceptibility test included eight antimicrobial agents: clindamycin, ciprofloxacin, co-trimoxazole, erythromycin, gentamicin, oxacillin, penicillin, and tetracycline (Becton Dickinson, USA), and was performed by the disk diffusion method in accordance with the guidelines set by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) [13]. Interpretation of the results was performed according to CLSI recommendations [13]. Methicillin susceptibility was verified by *mecA* gene amplification [9].

Statistical analysis

Continuous variables were presented as medians and ranges. Association between the presence of *lukS/lukF-PV* genes

and *agr* group IV specificity was verified with Fisher exact test, similar to the significance of differences in *S. aureus* nasal carriage rates between RF patients and the controls. Calculations were performed using Statistica 8 (StatSoft®, Poland) software, and statistical significance was defined as $p \leq 0.05$.

Results

The median age of patients was 29 years (range 5-45 years). Most patients (14/44) studied were aged 21 to 30, whereas only 2 patients were between the ages of 0 and 10. There were 24 males and 20 females. Median time from RF diagnosis was 24 months (range 4-120 months). Furuncles were present on the buttocks (20/44), lower limbs (19/44), chest (14/44), upper limbs (11/44), back (8/44) and face (1/44). Nearly half of RF patients (21/44) had furuncles in more than one location (usually in two or three anatomical regions). Nine subjects declared familial history of RF (two or three relatives affected). Only two patients in the examined group suffered from predisposing factors of RF: diabetes type 2 or chronic myeloid leukaemia.

The strains isolated from furuncles were resistant to penicillin (42/44), clindamycin (3/44), erythromycin (9/44), and tetracycline (5/44). The number of the strains simultaneously resistant to two (penicillin, erythromycin) or three antibiotics (penicillin, erythromycin, clindamycin) totalled 7/44 and 3/44, respectively. All strains showed susceptibility to methicillin, confirmed either with the use of the disc diffusion method or by means of PCR.

Thirty-five out of 44 strains tested were positive for leukocidin *lukS/lukF-PV* genes and 12/44 for enterotoxin *seb* gene (figure 1). The coexistence of PVL genes and *seb* gene concerned 7/44 strains. The remaining toxin genes were not found.

Forty-three strains belonged to *agr* specificity group IV and one strain was classified as *agr* group II (figure 2). All strains with *lukS/lukF-PV* genes belonged to *agr* specificity group IV (35/43 vs. 0/1 in *agr* group II, $p = 0.205$).

Nasal carriage of *S. aureus* was observed in 27/44 (61.3%) RF patients and in 43/150 (28.6%) controls ($p = 0.001$). Characteristics of the nasal strains of *S. aureus* isolated from RF patients and the controls are summarized in table 1. In all the RF subjects, nasal strains did not differ from

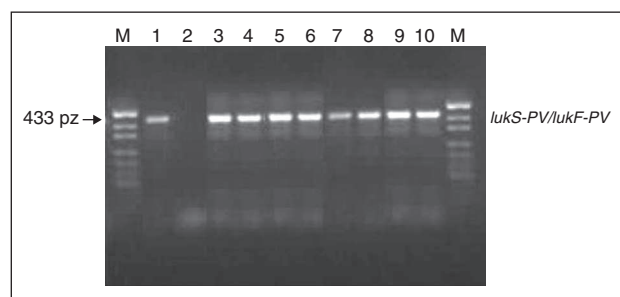


Figure 1. PCR detection of *lukS-PV/lukF-PV* gene. M—molecular size marker (*pUC19 DNA/MspI* enzyme, Fermentas, Lithuania); lane 1—positive control; lane 2—negative control; lanes 3 to 10—representative PVL positive *S. aureus* strains from recurrent furunculosis.

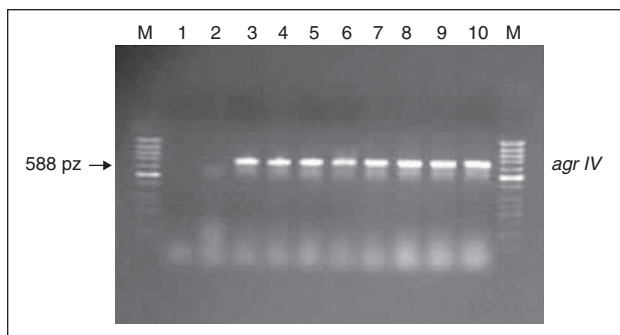


Figure 2. Multiplex PCR detection of *S. aureus* from recurrent furunculosis *agr* group. M—molecular size marker (GeneRuler™ 50 bp DNALadder, Fermentas, Lithuania); lane 1—negative control; lane 2—*S. aureus* strain *agr* group II; lanes 3 to 10—representative *S. aureus* strains *agr* group IV.

Table 1. *Agr* and toxin gene characteristics of the nasal strains of *S. aureus* isolated from patients with recurrent furunculosis and from healthy controls

<i>Agr</i> /toxin genes	RF patients	Controls	<i>p</i> value*
<i>Agr</i> I	0	17/43	0.001
<i>Agr</i> II	0	7/43	0.269
<i>Agr</i> III	0	13/43	0.001
<i>Agr</i> IV	27/27	6/43	< 0.001
sea	0	3/43	0.225
seb	6/27	1/43	0.011
sec	0	5/43	0.080
sed	0	1/43	0.614
tst	0	3/43	0.225
eta	0	2/43	0.374
etb	0	1/43	0.614
lukS/lukF-PV	21/27	0/43	< 0.001

* Fischer exact test

those isolated from furuncles in terms of *lukS/lukF-PV* gene status and *agr* specificity.

Discussion

Recurrent furunculosis frequently occurs among young people and is characterised by a complex pathogenesis which has not yet been fully explained [2, 5]. Many risk factors contribute to the recurrence of furuncles, including: obesity, alcoholism, bad dietary habits, haematological disorders, immunosuppression, AIDS, and diabetes [1]. However, only two patients in the group we examined suffered from predisposing factors of RF. Similar to our study, other authors have also shown that young adults without underlying systemic diseases predominate among furunculosis patients [2, 3, 5].

Similar to previous experiments [1, 5, 14], this study showed that the fraction of *S. aureus* nasal carriers is higher amongst RF patients than in healthy controls. According to Toshkova *et al.* [15], nasal carriage may occur in up to 100% of RF subjects. Many previous studies showed

that staphylococci isolated from invasive infections, bacteremia, pneumonia, bone infections or meningitis belong to *agr* groups I-III, and group IV specificity is sporadic [8, 16-18]. However, *S. aureus* strains causing SSS or impetigo belong to group IV and are characterised by their ability to produce exfoliative toxin [7, 19]. In the present study, we found that 43/44 strains isolated from recurrent furunculosis and only 6/43 strains from nasal carriers of *S. aureus* who were free of RF belonged to *agr* group IV. It has been previously reported that only 39.6% of strains found in skin abscesses or furuncles belong to this group [20]. To the best of our knowledge, we were the first study to observe such a predominance of *agr* group IV strains in RF patients. Additionally, a high percentage of the strains from RF patients (but none from the controls) encoded Pantone-Valentine leucocidin and all of them belonged to *agr* group IV. PVL is a cytotoxin that causes leukocyte destruction and tissue necrosis. The PVL gene has been detected in *S. aureus* strains associated with community-acquired, severe, necrotizing pneumonia and also with furunculosis [11]. The frequency of PVL gene positive strains isolated from RF patients varies with geography. The high fraction (35/44) that we reported is similar to the results of other European studies [11]. According to the literature, PVL gene-positive strain occurrence ranges from 30% in Western Africa, 40% in Japan, up to 93% in France [2, 11, 21].

Producing leukocidin also has an impact on the recurrence of furuncles. Couppie *et al.* [22] reported that 92% of *S. aureus* strains isolated from persons with recurrent furunculosis produced PVL, compared to only 33% of strains found in sporadic furuncles. These results are consistent with the high frequency of PVL positive strains found during our study on RF patients. The occurrence of *lukS/F-PV* genes constitutes a risk of a more severe course of furunculosis. According to Yamasaki *et al.* [2], furuncles caused by PVL gene-positive *S. aureus* have been associated with more intense erythema around the lesions, reflecting a strong inflammation caused by polymorphonuclear cells and capillary dilation.

A few studies have shown that the PVL locus is a stable genetic marker of community-acquired methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) [23]. However, resistance to methicillin is also typical of PVL positive strains isolated from pneumonia, septicemia or other systemic infection and not from furunculosis. Along with our investigations, Nolte *et al.* [20], Wiese-Posselt *et al.* [24], and Perez-Roth *et al.* [25] also found that PVL positive *S. aureus* isolated from furunculosis were susceptible to methicillin (MSSA), in contrast to strains isolated from severe infections. However, our study revealed a high frequency of strains encoding PVL toxin among methicillin-susceptible staphylococci isolated from RF patients. This finding proves that the diagnosis of such infections should not be limited to antibiotic susceptibility testing.

Conclusion

Nasal carriage of *S. aureus* in RF patients is significantly more frequent than in healthy individuals. Methicillin-susceptible strains of *agr* specificity group IV, most of them with *lukS/lukF-PV* genes, predominate amongst *S. aureus* strains isolated from RF patients. ■

Disclosure. Financial support: none. Conflict of interest: none.

References

1. Nowicki R, Barańska-Rybak W, Artukowicz E, Samet A. The role of *Staphylococcus aureus* in the skin diseases. *Zakażenia* 2003; 4: 90-5.
2. Yamasaki O, Kaneko J, Morizane S, et al. The association between *Staphylococcus aureus* strains carrying Panton-Valentine leukocidin genes and the development of deep-seated follicular infection. *Clin Infect Dis* 2005; 40: 381-5.
3. Zimakoff J, Rosdahl VT, Petersen W, Scheibel J. Recurrent staphylococcal furunculosis in families. *Scand J Infect Dis* 1988; 20: 403-5.
4. Barańska-Rybak W, Nowicki R, Sokółowska-Wojdyło M, et al. The potential role of antimicrobial peptides in recurrent furunculosis. *Pol J Environ Stud* 2009; 18: 179-83.
5. El-Gilany AH, Fathy H. Risk factors of recurrent furunculosis. *Dermatol Online J* 2009; 15: 16.
6. Bronner S, Monteil H, Prevost G. Regulation of virulence determinants in *Staphylococcus aureus*: complexity and applications. *FEMS Microb Rev* 2004; 28: 183-200.
7. Jarraud S, Lyon GJ, Figueiredo AM, et al. Exfoliatin-producing strains define a fourth agr specificity group in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 2000; 182: 6517-22.
8. Moore PCL, Lindsay JA. Genetic variation among hospital isolates of methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*: evidence for horizontal transfer of virulence genes. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 2760-7.
9. 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: 471-5.
10. Mehrotra M, Wang G, Johnson WM. 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: 1032-5.
11. Lina G, Piémont Y, Godail-Gamot F, et al. Involvement of Panton-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. *Clin Infect Dis* 1999; 29: 1128-32.
12. Shopsis B, Mathema B, Alcabes P, et al. Prevalence of agr specificity groups among *Staphylococcus aureus* strains colonizing children and their guardians. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 456-9.
13. Clinical and Laboratory Standards Institute *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing*. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2006.
14. Masiuk H, Kopron K, Grumann D, et al. Association of recurrent furunculosis with Panton-Valentine leukocidin and the genetic background of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 2010; 48: 1527-35.
15. Toshkova K, Annemüller C, Akineden O, Lämmler C. The significance of nasal carriage of *Staphylococcus aureus* as risk factor for human skin infections. *FEMS Microbiol Lett* 2001; 202: 17-24.
16. Ben Ayed S, Boutiba-Ben Boubaker I, Samir E, Ben Redjeb S. Prevalence of agr specificity groups among methicillin resistant *Staphylococcus aureus* circulating at Charles Nicolle hospital of Tunis. *Pathol Biol (Paris)* 2006; 54: 8-9.
17. Garbacz K, Piechowicz L, Wiśniewska K, Dąbrowska-Szponar M. Diversification of agr locus among *Staphylococcus aureus* isolated from carriers and from hospital patients with infection syndroms. *Med Dośw Mikrobiol* 2009; 61: 5-9.
18. Yoon HJ, Choi JY, Lee K, Yong D, Kim JM, Song YG. Accessory gene regulator group polymorphisms in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an association with clinical significance. *Yonsei Med J* 2007; 30: 176-83.
19. Jarraud S, Mougél Ch S, Thioulouse J, et al. Relationships between *Staphylococcus aureus* genetic background, virulence factors, agr groups (alleles), and human disease. *Infect Immun* 2002; 70: 631-41.
20. Nolte O, Haag H, Zimmerman A, Geiss HK. *Staphylococcus aureus* positive for Panton-Valentine leukocidin genes but susceptible to methicillin in patients with furuncles. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2005; 24: 477-9.
21. Baba Mussa L, Sanni A, Dagnra AY. Approche épidémiologique de l'antibiorésistance et de la production de leucotoxines par les souches de *Staphylococcus aureus* isolées en Afrique de l'Ouest. *Med Mal Infect* 1999; 29: 689-96.
22. Couppe P, Cribier B, Prevost G. Leukocidin from *Staphylococcus aureus* and cutaneous infections: an epidemiologic study. *Arch Dermatol* 1994; 130: 1208-9.
23. Boyle-Vavra S, Daum RS. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: the role of Panton-Valentine leukocidin. *Lab Invest* 2007; 87: 3-9.
24. Wiese-Posselt M, Heuck D, Draeger A, et al. Successful termination of a furunculosis outbreak due to lukS-lukF-positive, methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* in a German village by stringent decolonization, 2002-2005. *Clin Infect Dis* 2007; 44: 88-9.
25. Pérez-Roth E, Alcoba-Flórez J, López-Aguilar C, Gutiérrez-González I, Rivero-Pérez B, Méndez-Alvarez S. Familial furunculosis associated with community-acquired leukocidin-positive methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* ST152. *J Clin Microbiol* 2010; 48: 329-32.

Screening of *Staphylococcus aureus* nasal strains isolated from medical students for toxin genes

L. Piechowicz · K. Garbacz · K. Wiśniewska ·
M. Dąbrowska-Szponar

Received: 16 October 2010 / Accepted: 18 February 2011 / Published online: 31 May 2011
© Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, v.v.i. 2011

Abstract Three hundred twenty-one students (156 students with no clinical exposure and 165 students with clinical exposure) were screened for nasal colonization by *Staphylococcus aureus*; 20.9% of students were *S. aureus* nasal carriers, and 40.3% of *S. aureus* isolates harbored toxin genes. The most prevalent genes were *tst* (15.0 %) and *sec* (13.4 %). Isolates with multiple genes were only found among clinical students ($p=0.045$). Six of 11 PFGE clones were positive for toxin genes. Methicillin-resistant (MRSA) isolates were only detected in the clinical students (4.5 %). The exposure of students to the hospital environment neither radically increased *S. aureus* nasal carriage, nor the frequency of clinically important toxin gene presence, but it could have influenced the positive selection of toxigenic MRSA strains.

Staphylococcus aureus is a major cause of hospital and community-acquired infections worldwide (Chambers 2001). Approximately 20% of healthy adults humans are *S. aureus* nasal carriers persistently, while as many as 60% can be colonized intermittently (Kluytmans et al. 1997). More recent studies have reported rates of $\approx 27\%$ in healthy adult populations (Munckhof et al. 2009; Wertheim et al. 2005). It was found that the nasal carriage of *S. aureus* has been between 29% and 43% among medical students, but higher carriage rates can appear during epidemics (Bischoff et al. 2004; Kingdom et al. 1983; Stubbs et al. 1994). The

nasal carriage of *S. aureus* among hospital personnel as well as medical students represents a major risk factor for subsequent nosocomial infections and transmission of this pathogen (Wenzel and Pearl 1995; Sivaraman et al. 2009). *S. aureus* strains isolated from nasal carriers may be resistant to methicillin (MRSA). There are generally community-associated MRSA (CA-MRSA) which differ from hospital-associated (HA-MRSA) strains in terms of epidemiology, microbiology, and clinical manifestations (Millar et al. 2007; French 2009).

S. aureus produces a variety of extracellular toxins and virulence factors that contribute to its virulence potential. Some of them may play important roles in specific pathogenic processes. Exfoliative toxins are characteristic for isolates causing staphylococcal scalded-skin syndrome (SSSS), while toxic shock syndrome toxin-1 (TSST-1) often appears together with septic shock and toxic shock syndromes (Bohach and Foster 2000; Kondo et al. 1975; Opal et al. 1988). Panton–Valentine leukocidin (PVL) is a cytotoxin that causes leukocyte destruction and tissue necrosis. The PVL gene has been detected in *S. aureus* strains associated with community-acquired, severe, necrotizing pneumonia, and also furunculosis (Lina et al. 1999).

The aim of this study was to investigate: (1) the carriage rate of *S. aureus* among a preclinical and a clinical group of students, (2) the distribution of toxin genes in *S. aureus* isolates from both groups, (3) their susceptibility to antibiotics, and (4) the clonal relationships between these strains.

L. Piechowicz · K. Garbacz (✉) · K. Wiśniewska ·
M. Dąbrowska-Szponar
Department of Medical Microbiology,
Medical University of Gdańsk,
ul. Do Studzienki 38,
80-227 Gdańsk, Poland
e-mail: kasgab@gumed.edu.pl

Materials and methods

Bacterial strains A total of 321 *Gdańsk Medical University* students were screened for nasal colonization by *S. aureus*

during a 1-month period in 2007. The group was comprised of 156 first-year preclinical medical students with no clinical exposure (Group PC), and 165 third-year clinical medical students who were exposed to a hospital environment 1 day/week for 9 months (Group C). One isolate from each person was included. The nasal swabs were inoculated directly onto 5 % of sheep blood agar (*Oxoid*, UK) then incubated for 48 h at 37°C. The final *S. aureus* identification was performed on the basis of the API ID32Staph system (*bioMérieux*, France). Control strains for the PCR detection of virulence factor genes were obtained from the *National Institute of Public Health* (Warsaw, Poland).

Toxin genes detection DNA was isolated according to Bania et al. (2006a). DNA amplification was carried out in a *Perkin Elmer* 2400 thermocycler (USA). The primers for enterotoxin (SEA, SEB, SEC, and SED), TSST-1, and exfoliative toxin (ETA, ETB) genes were used (Mehrotra et al. 2000). The amplification of the PVL gene was performed according to Lina et al. (1999). The PCR products were analyzed on 2% agarose gel (Sigma, USA) in the presence of ethidium bromide.

Molecular typing Chromosomal grade genomic DNA preparation and *Sma*I (*Fermentas*, Lithuania) digestion were done according to de Lencastre et al. (1994). The pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) results were interpreted according to Tenover et al. (1995). *Sma*I PFGE patterns were created using Molecular Analyst Software database (*Applied Math/BioRad*, USA) and analyzed using the Dice coefficient-UPMGA. The PFGE types were marked with capital letters and the subtypes indicating closely related isolates received an additional Arabic number.

***mecA* gene detection and antibiotic susceptibility testing** Detection of the gene (*mecA*) for methicillin resistance was done according to Barski et al. (1996). Antibiotic susceptibility testing of *S. aureus* was performed by the disk diffusion method according to the guidelines of NCCLS (1994) and Hryniewicz et al. (2001). Antibiotics tested were: gentamicin, erythromycin, clindamycin, ciprofloxacin, tetracycline, chloramphenicol, rifampicin, cotrimoxazole, vancomycin, and fusidic acid (*Becton Dickinson*, USA).

Statistical analysis Association between the presence of certain *S. aureus* isolates and student group (preclinical vs. clinical one) was verified with Fisher's exact test. Calculations were performed using Statistica 8 (*StatSoft*®, Poland) software, and statistical significance was defined as $p \leq 0.05$.

Results and discussion

The nasal carriage of *S. aureus* among medical personnel, such as students during their clinical practice, is an important source of nosocomial infections (Wenzel and Pearl 1995). The infection caused by toxigenic staphylococcal strain exposes patient to the danger of severe disease with toxemia. *S. aureus* nasal carriage rates in students may increase with their clinical exposure (Güçlü et al. 2007). For that reason, the purpose of the first part of our work was to estimate *S. aureus* nasal carriage rates among preclinical and clinical groups of medical students. Analysis of the 321 nasal swabs showed that 67 (20.9%) medical students were *S. aureus* nasal carriers, including 30 (19.2%) and 37 (22.4%) isolates from the PC and C groups, respectively ($p=0.482$). The carriage of PC and C groups was similar. The same phenomenon was observed by Kingdom et al. (1983) in Ireland, Stubbs et al. (1994) in Australia, and Bischoff et al. (2004) in the USA.

Detection of virulence-associated genes in *S. aureus* nasal isolates revealed that 27 (40.3%) of all *S. aureus* isolates were positive for at least one toxin gene. The most prevalent genes were *tst* (15.0%) and *sec* (13.4%; Table 1). Other investigators have also reported that about 20% of *S.*

Table 1 Prevalence of *Staphylococcus aureus* with single and multiple toxin genes among 67 nasal isolates from preclinical (Group PC) and clinical students (Group C)^a

Toxin genes	Group PC (n=30)		Group C (n=37)		p Value ^b	Total (n=67)	
Single gene							
<i>sea</i>	0	0	4	10.8	0.086	4	6.0
<i>seb</i>	0	0	1	2.7	0.552	1	1.5
<i>sec</i>	4	13.3	4	10.8	0.520	8	11.9
<i>sed</i>	0	0	1	2.7	0.552	1	1.5
<i>tst</i>	2	6.7	3	8.1	0.600	5	7.5
<i>eta</i>	2	6.7	0	0	0.197	2	3.0
<i>etb</i>	1	3.3	0	0	0.448	1	1.5
<i>lukS/lukF-PV</i>	0	0	0	0	–	0	0
Total single	9	30.0	13	35.1	0.429	22	32.8
Multiple genes							
<i>sea/tst</i>	0	0	3	8.1	0.162	3	4.5
<i>sec/tst</i>	0	0	1	2.7	0.552	1	1.5
<i>sed/tst</i>	0	0	1	2.7	0.552	1	1.5
Total multiple	0	0	5	13.5	0.045	5	7.5
Total positive	9	30.0	18	48.6	0.097	27	40.3

sea staphylococcal enterotoxins SEA, *seb* SEB, *sec* SEC, *sed* SED, *eta* exfoliative toxins ETA, *etb* ETB, *tst* TSST-1, *lukS/lukF-PV* leukocidine PV

^a First columns—number, second columns—percentage

^b Fisher's exact test

aureus strains from nasal carriers harbored the *tst* gene and about 7.5–17.5% were positive for the *sec* gene (Mehrotra et al. 2000; Peacock et al. 2002; Bania et al. 2006b). Nosocomial infections with aforementioned strains causing toxic shock syndrome, staphylococcal scarlet fever, and neonatal toxic shock-like exanthematous diseases were described (van der Mee-Marquet et al. 2003). Thus, from the clinical point of view, these strains must nevertheless be considered potentially toxigenic. The remaining genes (*sea*, *seb*, *sed*, *eta*, *etb*) were also detected (between 1.5% and 6.0%; Table 1). The detected combinations were: *tst* gene with *sea* ($n=3$), *tst* with *sec* ($n=1$), and *tst* with *sed* ($n=1$). The isolates with multiple genes were found only among *S. aureus* from clinical students ($p=0.045$, Table 1). According to van Leeuwen et al. (2005), the virulence potential is reflected by the number of virulence genes per strain. It thereby follows that *S. aureus* isolates from the clinical students have a higher virulence potential than the isolates from the preclinical group. Additionally, despite exfoliative toxins are associated with SSSS we found strains from nasal carriers harbored the *eta/etb* gene, similar results received Peacock et al. (2002).

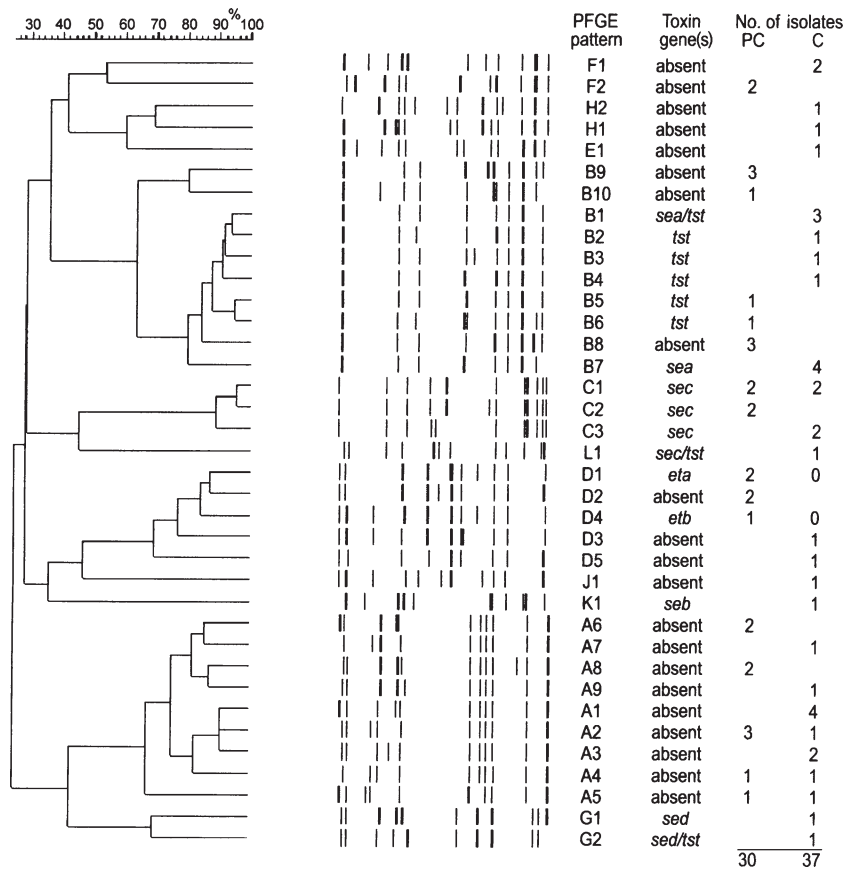
A high heterogeneity of *Sma*I macrorestriction profiles was found in all of the *S. aureus* isolates. A 58% similarity cutoff value gave 11 different (A–L) PFGE clusters and 37

distinct PFGE patterns (subtypes), including genetically related isolates. The isolates positive for toxin genes were detected in six (B, C, D, G, L, and K) clones. Three of them (B, C, and D) were the most numerous (15, 10, and 10 isolates, respectively) and comprised 52.2% of all *S. aureus* isolates. These clones were found both in preclinical and clinical students (Fig. 1).

The presence of some genes was correlated with the PFGE types. The clone C was specific only for *sec*-positive isolates, similarly to clone D with *eta/etb*-positive isolates. Other research groups have reported that certain staphylococcal toxin genes are associated with particular clonal lineages (Holtfreter et al. 2007).

Antimicrobial resistance rates ranged from 3.2% for chloramphenicol to 80.6% for penicillin. Tetracycline resistance was found in 29%, and erythromycin and clindamycin resistance in 25.8% of isolates. All strains showed susceptibility to gentamicin, ciprofloxacin, rifampicin, cotrimoxazole, vancomycin, and fusidic acid. We found three *S. aureus* isolates resistant to methicillin (MRSA; 4.5%). Taking in account all investigated medical students (321), the prevalence of MRSA strains was 0.9%. They were resistant to tetracycline, erythromycin, clindamycin, and chloramphenicol ($n=1$), or erythromycin and clindamycin ($n=2$). The MRSA strains belonged to clones

Fig. 1 PFGE dendrogram of 67 *S. aureus* nasal isolates generated by the UPGMA algorithm. Toxin genes: *sea* staphylococcal enterotoxin SEA, *seb* staphylococcal enterotoxin SEB, *sec* staphylococcal enterotoxin SEC, *sed* staphylococcal enterotoxin SED, *see* staphylococcal enterotoxin SEE, *eta* exfoliative toxin ETA, *etb* exfoliative toxin ETB, *tst* TSST-1, *PC* *S. aureus* from preclinical group of students, *C* *S. aureus* from clinical group of students, % percentage of similarity



K (subtype K1) or C (subtype C1) and were positive for *seb* or *sec* genes.

The prevalence of MRSA nasal carriage in student community ranges from 0 (Stubbs et al. 1994) to 1.8–2.4% (Prates et al. 2010; Rackham et al. 2010) and seems to be similar to that which has been reported in general population (1.5%) (Rackham et al. 2010). Our results (0.9%) are consistent with these findings; however, it should be stressed that our MRSA strains were detected only in the clinical students. They showed a susceptible to most antibiotics, characteristic to community-associated MRSA strains isolated in student community (Prates et al. 2010; Rackham et al. 2010; Rohde et al. 2009; Shrestha et al. 2010).

In conclusion, the nasal colonization of preclinical and clinical students with *S. aureus* strains expressing various virulence genes make us consider them to be strains of potential virulence. However, the exposure of medical students to the hospital environment did not radically affect an increase in *S. aureus* nasal carriers or the frequency of clinically important staphylococcal toxin genes, though it could influence the positive selection of toxigenic MRSA strains.

We would like to thank Professor Waleria Hryniewicz from the National Institute of Public Health in Warsaw, Poland for providing the toxin-producing *S. aureus* reference strains used in this study.

References

- Bania J, Dąbrowska A, Korzekwa K, Zarczyńska A, Bystron J (2006a) The profiles of enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* from nasal carriers. *Lett Appl Microbiol* 42:315–320
- Bania J, Dąbrowska A, Różalska B, Sadowska B, Wieckowska-Szakiel M, Korzekwa K, Zarczyńska A, Bystron J, Chrzanoska J, Molenda J (2006b) Superantigen types in *Staphylococcus aureus* isolated from patients with cystic fibrosis. *Folia Microbiol* 51:614–618
- Barski P, Piechowicz L, Galiński J, Kur J (1996) Rapid assay for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using multiplex PCR. *Mol Cell Probes* 10:471–475
- Bischoff WE, Wallis ML, Tucker KB, Reboussin BA, Sherertz R (2004) *Staphylococcus aureus* nasal carriage in a student community: prevalence, clonal relationships and risk factors. *Infect Control Hosp Epidemiol* 25:485–491
- Bohach GA, Foster TJ (2000) *Staphylococcus aureus* exotoxins. In: Fischetti VA, Novick RP, Ferretti JJ, Portnoy DA, Rood JI (eds) Gram positive pathogens. ASM, Washington, DC, pp 367–378
- Chambers HF (2001) The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*? *Emerg Infect Dis* 7:178–182
- French GL (2009) Methods for screening for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carriage. *Clin Microbiol Infect* 15:10–16
- Güçlü E, Yavuz T, Tokmak A, Behlçet M, Karali E (2007) Nasal carriage of pathogenic bacteria in medical students: effects of clinic exposure on prevalence and antibiotic susceptibility. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 264:85–88
- Holtfreter S, Grumann D, Schmutte M, Nguyen HT, Eichler P, Strommenger B, Kopron K, Kolata J, Giedrys-Kalemba S, Steinmetz I, Witte W, Bröker BM (2007) Clonal distribution of superantigen genes in clinical *Staphylococcus aureus* isolates. *J Clin Microbiol* 45:2669–80
- Hryniewicz W, Sulikowska A, Szczypa K, Gniadkowski M, Skoczyńska A (2001) Recommendations for susceptibility testing to antimicrobial agents of selected bacterial species. *Mikrobiol Med* 12:3–14
- Kingdom JCP, Joyce S, Bradley FL, Jauch W, Falkiner FR (1983) Staphylococcal nasal carriage in medical students with varying clinical exposure. *J Hosp Infect* 4:75–79
- Kluytmans J, van Belkum A, Verbrugh H (1997) Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. *Clin Microbiol Rev* 10:505–520
- Kondo I, Sekural S, Saral Y, Fukati S (1975) Two serotypes of exfoliatin and their distribution in staphylococcal strains isolated from patients with scalded skin syndrome. *J Clin Microbiol* 1:397–400
- de Lencastre H, Couto I, Santos I, Melo-Cristino J, Torres-Pereira A (1994) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* disease in a Portuguese hospital: characterization of clonal types by a combination of DNA typing methods. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 13:64–73
- Lina G, Piémont Y, Godail-Gamot F, Bes M, Peter MO (1999) Involvement of Panton-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. *Clin Infect Dis* 29:1128–1132
- Mehrotra M, Wang G, Johnson WM (2000) Multiplex PCR for detection of genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin 1, and methicillin resistance. *J Clin Microbiol* 38:1032–1035
- Millar BC, Loughrey A, Elborn JS, Moore JE (2007) Proposed definitions of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA). *J Hosp Infect* 67:109–113
- Munckhof WJ, Nimmo GR, Schooneveldt JM, Schlebusch S, Stephens AJ, Williams G, Huygens F, Giffard P (2009) Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*, including community-associated methicillin-resistant strains, in Queensland adults. *Clin Microbiol Infect* 15:149–155
- National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) (1994) Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests, 5th edn, Approved standard M2-A5. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne
- Opal SM, Johnson-Winegar AD, Gross AS (1988) Staphylococcal scalded skin syndrome in two immunocompetent adults caused by exfoliatin B-producing *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 26:1283–1286
- Peacock SJ, Moore CE, Justice A, Kantzanou M, Story L (2002) Virulent combinations of adhesin and toxin genes in natural populations of *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* 70:4987–4996
- Prates KA, Torres AM, Garcia LB, Ogatta SF, Cardoso CL, Tognim MC (2010) Nasal carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in university students. *Braz J Infect Dis* 14:316–318
- Rackham DM, Ray SM, Franks AS, Bielak KM, Pinn TM (2010) Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* nasal carriage in a college student athlete population. *Clin J Sport Med* 20:185–188
- Rohde RE, Denham R, Brannon A (2009) Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*: carriage rates and characterization of students in a Texas university. *Clin Lab Sci* 22:176–184
- Shrestha B, Pokhrel BM, Mohapatra TM (2010) Molecular epidemiology of MRSA among nasal carriers in a tertiary care hospital: first report from Nepal. *J Hosp Infect* 74:294–295

- Sivaraman K, Venkataraman N, Cole AM (2009) *Staphylococcus aureus* nasal carriage and its contributing factors. *Future Microbiol* 4:999–1008
- Stubbs E, Pegler M, Vickery A, Harbour C (1994) Nasal carriage of *Staphylococcus aureus* in Australian (preclinical and clinical) medical students. *J Hosp Infect* 27:127–134
- Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE (1995) Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 33:2233–2239
- van der Mee-Marquet N, Lina G, Quentin R, Yaouanc-Lapalle H, Fiebre C (2003) Staphylococcal exanthematous disease in a newborn due to a virulent methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain containing the TSST-1 gene in Europe: an alert for neonatologists. *J Clin Microbiol* 41:4883–4884
- van Leeuwen WB, Melles DC, Alaidan A, Al-Ahdal M, Boelens HAM (2005) Host- and tissue-specific pathogenic traits of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 187:4584–4591
- Wenzel R, Pearl T (1995) The significance of nasal carriage of *Staphylococcus aureus* and the incidence of postoperative wound infection. *J Hosp Infect* 31:13–24
- Wertheim HF, Melles DC, Vos MC, van Leeuwen W, van Belkum A, Verbrugh HA, Nouwen JL (2005) The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *Lancet Infect Dis* 5:751–762

Katarzyna Garbacz, Lidia Piechowicz, Katarzyna Wiśniewska,
Maria Dąbrowska-Szponar

ZRÓŻNICOWANIE LOCUS *agr* WŚRÓD *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* IZOLOWANYCH OD NOSICIELI ORAZ OD CHORYCH Z OBJAWAMI ZAKAŻENIA

Zakład Mikrobiologii Lekarskiej, Katedra Mikrobiologii
Akademii Medycznej w Gdańsku

Kierownik: dr n. med. M. Dąbrowska – Szponar

W celu określenia zróżnicowania regionu *agr* przebadano 50 szczepów *Staphylococcus aureus* izolowanych z przedsionka nosa od studentów medycyny i pielęgniarstwa oraz 50 szczepów *S. aureus* izolowanych od chorych, głównie ze zmian skórnych. Badanie wykazało, że szczepy wyosobnione osób zdrowych najczęściej należały do grup I (38%) i III (30%), w odróżnieniu od gronkowców izolowanych od chorych, gdzie dominowały grupy IV (50%) i II (24%). Jest to różnica statystycznie znamienne ($p < 0,05$). Gronkowce izolowane ze zmian skórnych należały przede wszystkim do IV grupy *agr*, w odróżnieniu od izolowanych z innych materiałów, które reprezentowały grupy I-III ($p < 0,05$).

Gronkowiec złocisty jest jednym z najczęstszych patogenów człowieka. Chorobotwórczość szczepów *Staphylococcus aureus* związana jest z wytwarzaniem szeregu toksyn oraz czynników wirulencji. Proces ten podlega systemowi globalnej regulacji ekspresji białek *agr* (*accessory gene regulator*) oraz *sar* i *xpr*, które modulują odpowiedź *agr* (5,12). Locus *agr* składa się z pięciu genów *agrA*, *agrB*, *agrC*, *agrD* i *hld* oraz zawiera dwie jednostki transkrypcyjne RNAII i RNAIII, znajdujące się pod kontrolą promotorów P2 i P3 (4). Aktywacja promotora P3 uruchamia transkrypcję RNAIII, który jest efektorową częścią systemu *agr* i reguluje ekspresję genów ponad 130 białek *S. aureus*. Locus *agr* kontroluje wytwarzanie najważniejszych toksyn *S. aureus*; enterotoksyn (*sea-sef*), toksyny szoku toksycznego (*tst*), eksfoliatyn A i B (*eta*, *etb*), leukocydyny (*luk-PV*), hemolizyn (α , β , γ , δ) oraz białek powierzchniowych; wiążących kolagen (*cna*), fibrynogen (*clfA*, *clfB*), fibronektynę (*fnbA*, *fnbB*) (4,12).

Polimorfizm locus *agr* (genów *agrC* i *agrD*) pozwolił na wyróżnienie w populacji gronkowców złocistych czterech grup specyficzności *agr* (I, II, III, IV). Przynależność szczepu *S. aureus* do grupy *agr* jest skorelowana z jego pochodzeniem, wytwarzaniem toksyn i wirulencją (3,4,13). Szczepy izolowane z zespołu złuszczonej skóry (SSS) wytwarzające

eksfoliatyny należą najczęściej do IV grupy *agr* (7), szczepy izolowane z zespołu wstrząsu toksycznego (TSS) do III (10), a wytwarzające leukocydyny do II (1).

Celem pracy było określenie przynależności do czterech grup specyficzności *agr* szczepów *S. aureus* wyizolowanych od nosicieli oraz od chorych, głównie ze zmianami skórnymi.

MATERIAŁ I METODY

Szczepy bakteryjne. Badania przeprowadzono na 50 szczepach *S. aureus* wyizolowanych w latach 2005-2006 z wymazów z nosa od studentów medycyny i pielęgniarstwa Akademii Medycznej w Gdańsku oraz na 50 szczepach *S. aureus* wyizolowanych od chorych z 5 szpitali Polski północnej (w większości z Kliniki Dermatologii, Wenerologii i Alergologii AMG). Każdy izolat pochodził z próbki materiału klinicznego pobranego od innego pacjenta.

Izolacja bakteryjnego DNA. Izolację przeprowadzono według metodyki *Barskiego* i wsp. (2) odwirowując 1 ml nocnej bulionowej hodowli *S. aureus* (TSB, 18 godz. w 37°C), osad zawieszono w 200 µl 2% Triton X-100 w 2M NaCl i dodawano 5 µg lizostafiny (Sigma). Po dokładnym wymieszaniu, zawiesinę inkubowano (30 min w 37°C), dodawano 20 µg proteinazy K (Sigma) i inkubowano (15 min w 65°C). Zawiesinę chłodzono do temperatury pokojowej, dodawano 400 µl chloroform żelu (A&ABiotechnology), wortexowano i wirowano (8000 rpm/min., 5 min). Górną warstwę odciągano do probówki z 300 µl alkoholu izopropylowego i przechowywano przez noc w temp. -20°C w celu wytrącenia DNA. Próbkę odwirowano (12000 rpm/min 5 min), uzyskany osad przemywano (70% etanolem w temp. 4°C). Po ponownym odwirowaniu (12000 rpm/min 5 min) osad suszono (temp. pokojowa, 15 min), zawieszano w 100 µl buforu TE (Serwa). Stężenie DNA mierzono spektrofotometrycznie (kalkulator DNA/RNA, Pharmacia Biotech.). Do reakcji PCR używano DNA rozcieńczonego jałową, dejonizowaną wodą, o stężeniu 5 ng/µl.

Identyfikacja grupy *agr*. Wykrywanie czterech grup specyficzności *agr* (I, II, III i IV) prowadzono zgodnie z metodyką *Shopsin* i wsp. (11) w amplifikatorze 2400 (Perkin-Elmer), zgodnie ze schematem: 94°C przez 5 min oraz 25 cykli, zaczynając od 94°C przez 1 min, 55°C przez 1 min, 72°C przez 1 min, a w ostatnim cyklu dodatkowo 72°C przez 30 s. Amplikony analizowano po elektroforezie w 2% żelu agarozowym, w świetle UV.

Obliczenia statystyczne. W celu określenia związku między zmiennymi jakościowymi stosowano test niezależności χ^2 , przyjmując poziom istotności $p=0,05$, przy wartości krytycznej $\chi^2=3,841$ (9).

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Szczepy *S. aureus* wyizolowane od nosicieli były zróżnicowane pod względem grup specyficzności *agr*. Najwięcej z nich należało do I grupy (38%), następnie do III (30%), IV (18%) i II (4%) (Tabela I). Jak wynika z badań przeprowadzonych w innych krajach (Stany Zjednoczone, Irlandia) szczepy od nosicieli reprezentują najczęściej pierwsze trzy grupy *agr*, podczas gdy IV jest nieliczna (2,5%) lub niewykrywana (6,11). Przynależność do IV grupy, aż 18% badanych przez nas gronkowców, może wynikać z wyizolowania ich od nie-

przypadkowej grupy nosicieli, jaką byli studenci medycyny i pielęgniarstwa, mający kontakt z pacjentami szpitalnymi. Wyższy odsetek szczepów IV grupy *agr* odnotowano również w badaniach nosicielstwa *S. aureus* u studentów kierunków medycznych w Lyonie (8).

Tabela I. Występowanie grup *agr* wśród szczepów *S. aureus* izolowanych od nosicieli oraz od chorych

Grupa <i>agr</i>	Szczepy <i>S. aureus</i> od nosicieli (%)	Szczepy <i>S. aureus</i> od chorych (%)
I	19 (38)	9 (18)
II	7 (14)	12 (24)
III	15 (30)	4 (8)
IV	9 (18)	25 (50)

Wśród szczepów *S. aureus* wyizolowanych z próbek materiału klinicznego od chorych połowa reprezentowała IV grupę *agr* oraz kolejno II (24%), I (18%) i III (8%) (Tabela II). Jest to różnica statystycznie znamienne ($p < 0,05$) w porównaniu ze szczepami od nosicieli, gdzie grupy IV i II były najmniej liczne. Gronkowce izolowane ze zmian skórnych należały do IV grupy *agr*, podczas gdy wyosobnione z innych materiałów; z krwi, gardła czy rurki tracheostomijnej reprezentowały grupy I-III ($p < 0,05$) (Tabela II). Jak wynika z badań wśród gronkowców izolowanych z zakażeń inwazyjnych; bakteriemii, pneumonii, zapaleń kości czy zapaleń opon mózgowo-rdzeniowych występowanie IV grupy *agr* jest sporadyczne (3,10,14). Natomiast badania Jarraud i wsp. pokazują, że *S. aureus* wywołujące zespół oparzonej skóry (SSS) czy liszajec pęcherzowy należą do IV grupy i charakteryzuje je zdolność wytwarzania toksyny eksfoliatywnej (7). W związku z tym pochodzenie większości wyosobnionych przez nas szczepów ze zmian skórnych może tłumaczyć dominację wśród nich IV grupy. Badane gronkowce pochodziły między innymi z liszajca pęcherzowego, ale głównie z zakażeń ran, czyraków i ropni. Niniejsze wyniki dowodzą, że *S. aureus* wywołujące infekcje skóry, inne niż SSS czy liszajec, również reprezentują IV grupę *agr*. Dalszych badań wymaga, ustalenie czy wytwarzają one, podobnie jak szczepy wywołujące zespół oparzonej skóry bądź liszajec pęcherzowy, charakterystyczne czynniki wirulencji.

Tabela II. Występowanie grup *agr* wśród szczepów *S. aureus* w zależności od miejsca pobrania materiału

Grupa <i>agr</i>	Miejsce pobrania materiału								Ogółem
	rana	czyrak	wrzód	pęcherzyca noworodków	odleżyna	rurka tracheostom.	gardło	krew	
I	3		1	2		3			9
II	2		3		3		2	2	12
III						2	2		4
IV	10	9	2	3	1				25

K. Garbacz, L. Piechowicz, K. Wiśniewska, M. Dąbrowska-Szponar

DIVERSIFICATION OF *AGR* LOCUS AMONG *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ISOLATED FROM CARRIERS AND FROM HOSPITAL PATIENTS WITH INFECTION SYNDROMS

SUMMARY

In *Staphylococcus aureus*, the accessory gene regulator (*agr*) system globally controls the production of virulence factors. Strains of *S. aureus* can be divided into four major *agr* groups (I-IV) on the basis of *agrD* and *agrC* polymorphisms. The aim of this study was to estimate the prevalence of the four *agr* specificity groups among *S. aureus* strains isolated from health carriers and from hospital patients. Fifty *S. aureus* strains from nose swabs obtained from a medical students and fifty strains from hospital patients, mainly from dermatology, were identified by multiplex PCR. Most of *S. aureus* strains from carriers belonged to I (38%) and III(30%) group *agr*, in contrast to *S. aureus* strains from infections, which belonged mainly to IV (50%) and II (24%) group ($p < 0,05$). A relationship between *agr* group and type of disease was observed: *agr* group IV strains were associated with skin infection and *agr* groups I-III strains with other type of infections ($p < 0,05$).

PÍSMIENNICTWO

1. Arciola CR, Baldassarri L, Von Eiff C i inni. Prevalence of genes encoding for staphylococcal leukocidal toxins among clinical isolates of *Staphylococcus aureus* from implant orthopedic infections. Int J Artif Organs 2007; 30: 792-7.
2. Barski P, Piechowicz L, Galiński J i inni. Rapid assay for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using multiplex PCR. Mol Cel Probes 1996; 10: 471-5.
3. Ben Ayed S, Boutiba-Ben Boubaker I, Samir E. Prevalence of *agr* specificity groups among methicillin resistant *Staphylococcus aureus* circulating at Charles Nicolle hospital of Tunis. Pathol Biol (Paris) 2006; 54: 8-9.
4. Bronner S, Monteil H, Prevost G. Regulation of virulence determinants in *Staphylococcus aureus*: complexity and applications. FEMS Microb Rev 2004; 28: 183-200.
5. Chmiel D, Mickowska B. Systemy regulatorowe *agr* i *sar* u *Staphylococcus aureus*. Post Biol Kom 2002; 29: 103-20.
6. Collery MM, Smyth DS, Twohig JM i inni. 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: 348-58.
7. Jarraud S, Mougél Ch, Thioulouse J i inni. Relationships between *Staphylococcus aureus* genetic background, virulence factors, *agr* groups (alleles), and human disease. Infect Immun 2002; 70: 631-41.
8. Lina G, Boutite F, Tristan A i inni. Bacterial competition for human nasal cavity colonization: role of staphylococcal *agr* alleles. Appl Environ Microbiol 2003; 69: 18-23.
9. Łomnicki A. Wprowadzenie do statystyki przyrodników. PWN W-wa 2003: 188.
10. Moore PCL i Lindsay JA. Genetic variation among hospital isolates of methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*: evidence for horizontal transfer of virulence genes. J Clin Microbiol 2001; 39: 2760-7.
11. Shopsin B, Mathema B, Alcabes P i inni. Prevalence of *agr* specificity groups among *Staphylococcus aureus* strains colonizing children and their guardians. J Clin Microbiol 2003; 41: 456-9.
12. Wójcik KJ. Regulacja syntezy czynników wirulencji w komórkach szczepów *Staphylococcus aureus*. Post Biol Kom 1997; 24: 77-85.

13. *Wójcik KJ, Kowalska M, Kochanik i inni.* Analiza genetyczna szczepów *Staphylococcus aureus* wyizolowanych od chorych i od zdrowych nosicieli. *Post Mikrobiol Supl.* 2004; 43: 191.
14. *Yoon HJ, Choi JY, Lee K i inni.* Accessory gene regulator group polymorphisms in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an association with clinical significance. *Yonsei Med J* 2007; 30: 176-83.

Otrzymano: 26 IX 2008

Adres Autora: 80-227 Gdańsk, ul. Do Studzienki 38,
Zakład Mikrobiologii Lekarskiej AM w Gdańsku



ELSEVIER

Available online at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

Int. J. Hyg. Environ. Health 211 (2008) 273–282

International Journal
of Hygiene and
Environmental Health

www.elsevier.de/ijheh

***Staphylococcus aureus* of phage type 187 isolated from people occurred to be a genes carrier of enterotoxin C and toxic shock syndrome toxin-1 (TSST-1)**

Lidia Piechowicz*, Katarzyna Garbacz, Janusz Galiński

Department of Medical Microbiology, Medical University of Gdańsk, Do Studzienki 38, 80-227 Gdańsk, Poland

Received 19 June 2006; received in revised form 27 April 2007; accepted 18 June 2007

Abstract

The aim of this study was to examine the genotype properties of *Staphylococcus aureus* of phage type 187 strains that constitute a separate group among the strains of *S. aureus*. Sixteen strains were collected from the hospital patients ($n = 12$) and the healthy carriers ($n = 4$) in 13 medical centres in Poland during 1991 and 2005. Biotyping, antibiotic susceptibility, phage typing, detection the genes of enterotoxins and toxic shock syndrome toxin, genotyping of chromosomal DNA by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), also amplification and restriction analysis of the coagulase (*coa*) and the protein A genes (*spa*) (PCR/restriction fragment length polymorphism (RFLP)) was tested. The results of this study showed that all staphylococcus of phage type 187 belonged to the human biotype (A) and appeared to be sensitive to all of the tested antibiotics, including methicillin (MSSA). Finding out the toxin genes showed that almost all of them (93.8%) had the enterotoxin C gene (*sec*) and TSST-1 gene (*tst*). The PFGE typing proved that the phage type 187 strains (except for one) constitute one PFGE type. These results and the identical restriction patterns in the PCR/RFLP method, also the same biotype, sensitivity to antibiotics and the presence genes of the same type of toxins confirmed that the phage type 187 strains constitute one clone within our country. Additionally, the fact that almost all of them have the enterotoxin genes and *tst* gene allows to consider them the strains of potentially high virulence.

© 2007 Elsevier GmbH. All rights reserved.

Keywords: *Staphylococcus aureus*; Phagotype 187; Enterotoxin; Toxic shock syndrome toxin-1; RFLP; PFGE

Introduction

Staphylococcus aureus is worldwide recognized as a causative of various purulent diseases in both humans and animals. Among *S. aureus* sensitive to phage 187 there are two groups of strains. One of them derived from people is included in biotype A, and the other one isolated from dogs belongs to biotype E (Kryński et al.,

1981). The strains isolated from sick dogs were differed from those of human origin in respect of lack of ability to coagulation human plasma while possessing the ability to coagulation of canine plasma (Live, 1973). It should be pointed out that there are strains of biotype E isolated from people (Kryński et al., 1981).

The strains of phage type 187 from human origin are isolated from lesions as well as healthy carriers. They constitute approximately about 2% of the strains, hence there are few studies regarding their cases (Krzywińska et al., 1999; Piechowicz et al., 2005). These strains differ

*Corresponding author. Tel.: +48 58 3491835; fax: +48 58 3491829.
E-mail address: lidiap@amg.gda.pl (L. Piechowicz).

Table 1. Characteristics of isolation of phage type 187 strains

Strain	Location of hospital	Ward	Site of isolation	Year of isolation
1	Siemianowice	Burns	Wound	1991
2	Tczew	Surgical	Wound	1993
3	Wejherowo	Probationary	Nose*	1993
4	Człuchów	Neonatal	Urine	1993
5	Słupsk	Laryngology	Throat	1993
6	Wejherowo	Probationary	Throat	1993
7	Kraków 1	Ambulatory	Nose *	1999
8	Kraków 1	Ambulatory	Nose *	1999
9	Kraków 1	Ambulatory	Nose *	2000
10	Gdańsk 1	Pulmonic	Sputum	2001
11	Gdańsk 1	ICU	Bronchial secretion	2001
12	Gdańsk 2	Radiotherapy	Wound	2002
13	Łębork	Pediatric	Throat	2004
14	Gdańsk 3	Dermatology	Wound	2004
15	Gdańsk 4	Laryngology	Ear	2004
16	Gdańsk 5	Ophthalmic	Eye	2005

* – carrier.

from other *S. aureus* not only in exclusive sensitivity to phage 187 but also in the presence of galactosamine (not glucosamine) on the cell wall as well as the biochemical and serologic properties. Contrary to other *S. aureus*, they are not usually able to ferment mannitol and produce urease, acetoin and fibrinolysin (Kryński et al., 1976).

From the above a question arises whether the phage type 187 should be also classified as a separate group with regard to genetic properties, such as the presence of genes for toxins production or differentiation in chromosomal DNA and in the variable areas of species-specific genes. The above properties of phage type 187 strains have not been the subject of investigation so far.

The aim of the work was to determine whether *S. aureus* of phage type 187 possess the genes of enterotoxins and toxic shock syndrome toxin. Second, to estimate whether the strains of homogenous phage type isolated from different medical centres in Poland are also genetically homogenous based on determination of pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) patterns of chromosomal SmaI digests and based on amplification (PCR) of the variable regions of the coagulase gene (*coa*) and protein A gene (*spa*) followed by restriction enzyme digestion and analysis of restriction fragment length polymorphism (RFLP) patterns.

Materials and methods

Bacterial strains

Sixteen *S. aureus* strains belonging to phage type 187 were isolated between 1991 and 2005 from various clinical materials: wounds [$n = 4$], throats [$n = 3$],

sputum [$n = 1$], tracheal secretion [$n = 1$], urine [$n = 1$], an ear [$n = 1$], an eye [$n = 1$] and nose swabs from out-patients (carriers) [$n = 4$]. The strains came from 11 medical centres located within Poland and were obtained during the investigation of nosocomial outbreak of *S. aureus* (Table 1). The following control strains were used in the study: *S. aureus* ATCC 25923 to test the antibiotics susceptibility by the disk diffusion method; *S. aureus* Cowan I and Wood 46 (from professor Oeding from Bergen) to test the level of protein A. *S. aureus* strains: 14004 NIPH, a positive control strain for *sea*, *tst* genes; 14005 NIPH, a positive control strain for *seb* gene, 14006 NIPH, a positive control strain for *sec*, *sed* genes, mecA-positive control, a highly resistant homogenous MRSA strain BM52 were kindly provided from National Institute of Public Health (Warsaw, Poland).

The examined and control strains were preserved with the use of TSB and 15% glycerol in the temperature of -70°C (Fritsch and Maniatis, 1989).

Biotyping

The clumping factor was tested with Staphyslide (Bio Merieux, France). The coagulation of human, rabbit and dog plasma was examined by mixing 0.8 ml of the strain broth culture (TSB, 37°C 24 h) with 0.2 ml of plasma, and was incubated in 37°C . The result was checked after 2, 4, 6, and 24 h of the incubation. Biochemical identification was carried out with the API ID32Staph system (Bio Merieux, France). For the demonstration of fibrinolysin 12% citrated plasma was added to nutrient agar. After standing in water bath at 56°C for 15 min, the mixture was poured in Petri dishes. The production of fibrinolysin reduces the turbidity of

the medium, resulting – after incubation at 37 °C for 18–22 h – in clear zone around staphylococcal colonies (Vogelsang et al., 1962). Production of α -, β -, and δ -hemolysins was noted on rabbit, sheep and human blood agar plates, respectively (Haque and Baldwin, 1964). Protein A was estimated with a dot blot method. 10 μ l of overnight broth cultures were spotted onto nitrocellulose sheets and air-dried. Non-specific binding sites were blocked with 3% bovine serum albumin in PBS for 1 h at room temperature after which peroxidase conjugated rabbit plasma was added to a concentration of 1/1000 for a further hour. After washing in PBS and in TBS (10 mM, pH 7.4), the sheet was immersed in freshly prepared 4-chloronaphthol reagent to develop the color. The amount of color was assumed to be dependent on the binding of gamma globulin by protein A (Kerr et al., 1990). DNase activity was detected by flooding DNase test agar with toluidine blue O (TBO) (Waller et al., 1985).

Antibiotic susceptibility

Antibiotics susceptibility testing was performed by the disk diffusion method according to NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1994) on Mueller-Hinton agar (Oxoid), for: oxacillin (1 μ g), penicillin (10 UI), cephalothin (30 μ g), carbenicillin (100 μ g), erythromycin (15 μ g), clindamycin (2 μ g), doxycyclin (30 μ g), ciprofloxacin (5 μ g), vancomycin (30 μ g), gentamycin (10 μ g), cotrimoxazole (23.75 μ g/1.25 μ g), rifampicin (10 μ g), chloramphenicol (30 μ g), bacitracin (10 μ g), mupirocin (200 μ g), fusidic acid (10 μ g) (Becton–Dickinson).

Phage typing

Bacteriophage susceptibility testing was performed at the Center of Phage Typing of staphylococci in Gdańsk according to the method of Blair and Williams (1961) using the international set of typing phages and additional phages: 88, 89, and 187. The phages in concentration of routine test dilution (RTD), as well as in 100 \times RTD were used. The strains were subdivided into phage groups I, II and III according to Parker (1983). All strains of phage-type 95 were recorded separately, as well as strains belonging to phage type 88/89, phage type 187, and phage – group V (combination of 94, 96 phages). A miscellaneous group included strains belonging to different lytic groups. A non-typable strains (NT) were not sensitive to phages at 100 \times RTD. The lytic pattern was determined after 18 h of incubation at 30 °C.

DNA isolation

DNA was isolated according to Barski et al. (1996).

Detection of gene (*mecA*) for methicillin resistance by PCR

Detection the gene (*mecA*) of methicillin resistance was detected according to Barski et al. (1996).

Multiplex PCR conditions for detection of enterotoxins and toxic shock syndrome toxin genes

Detection the genes of enterotoxins A–D (*sea-sed*) and TSST-1 (*tst*) was performed in 50 μ l of the mixture which consisted of: 5 μ l of bacterial DNA (5 ng/ μ l), 5 μ l 10 \times of the reaction buffer (Fermentas), 20 pmol (each) of *sea*, *seb*, *sec*, *sed* and *tst* (Genset Oligos according to Mehrotra et al. (2000), 200 μ M (each) dNTP, 2.5 U of Taq polymerase (Fermentas) and sterile, deionised water. DNA amplification was carried out in Perkin-Elmer 2400 thermocycler with the following thermal cycling profile: an initial denaturation at 94 °C for 5 min was followed by 35 cycles of amplification (denaturation at 94 °C for 2 min, annealing at 57 °C for 2 min, and extension at 72 °C for 1 min) and a final extension at 72 °C for 7 min.

Amplification and restriction analysis of the coagulase gene (*coa*) – PCR/RFLP

Strains were analyzed as described previously (Schwarzkopf et al., 1993) by using the primers COAG-2 and COAG-3 as described by Goh et al. (1992) (Genset Oligos). The PCR products were analyzed on 2% agarose gel. Restriction analysis of the PCR products was performed with *AluI* (Fermentas) according to the manufacturer's instructions. The restriction digest fragments were detected on 4% agarose gel in the presence of ethidium bromide and photographed under UV illumination.

Amplification and restriction analysis of the protein A gene (*spa*) – PCR/RFLP

The amplification of protein A gene (*spa*) was performed with using the primers *spa*-1 and *spa*-2 as described by Schwarzkopf et al. (1993). PCR was performed by adding 5 μ l of bacterial DNA (5 ng/ μ l), 5 μ l 10 \times of the reaction buffer (Fermentas), 50 pmol of each primer (Genset Oligos), 200 μ M (each) dNTP, 2.5 U of Taq polymerase (Fermentas) in total volume of 50 μ l of sterile, deionised water. The amplification was carried out in Perkin-Elmer 2400 thermocycler with the following thermal cycling profile according to Frenay et al. (1996): at 95 °C for 4 min and 25 cycles, each of which consisted of 95 °C for 1 min, 60 °C for 1 min, 72 °C for 1 min, in the last cycle at 72 °C for 3 min. Restriction analysis of the PCR products was performed with *HinfI* (Fermentas) according to the manufacturer's instructions. Both the PCR products and the restriction digest fragments were analyzed on 2.5% agarose gel in the presence of ethidium bromide and photographed under UV illumination.

Table 2. Biotyping of phage type 187 strains

Properties	Strains															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Fibrinolysin	+	+	+	–	+	–	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Pigment	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Coagulase-human plasma	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Coagulase-dog plasma	–	–	–	+	+	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Coagulase-rabbit plasma	–	+	+	+	+	+	–	+	+	–	+	–	+	+	+	+
Hemolysin alpha	+	–	+	+	–	+	–	–	+	+	–	+	+	–	+	+
Hemolysine beta	–	–	–	+	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Crystal violet type	c ^a	c	c	c	c	c	c	c	c	c	c	c	c	c	c	c
Clumping factor	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Thermonuclease	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Protein A	+	+	+	–	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Acetoin production	+	–	+	–	+	–	+	+	+	–	+	+	–	–	+	+
Urease production	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Fermentation of mannitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Biotype according to Hájek and Maršálek	A ^b	A	A	A/E ^c	A	A/E	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A

^ac – Violet colored growth on crystal violet agar (the negative reaction).

^bBiotype A – characteristic in staphylococci obtained from human origin.

^cBiotype A/E – biotypes intermediate, with properties characteristic both for *Staphylococci* obtained from human and animal origin (dogs, horses, minks).

PFGE typing

Chromosomal grade genomic DNA preparation and *SmaI* (New England, Biolabs, Beverly Mass.) digestion were carried out as described previously (De Lencastre et al., 1994). PFGE was run in an CHEF-DR II system (BioRad, USA). The PFGE results were interpreted according to Tenover et al. (1995). For classification of the isolates, those with identical patterns were considered representatives of a single PFGE type designated with capital letter, and isolates that differed by one to six bands were identified as subtypes of the same type, marked by additional Arabic number.

Results

Biotyping

All strains tested in this study produced a yellow–orange pigment, a clumping factor, thermostable nuclease and coagulated human plasma. The majority of them also produced protein A (93.7%), fibrinolysin (87.5%) and coagulated rabbit plasma (75%), however 6 (37.5%) of the 16 strains produced alpha hemolysin. The above-mentioned properties of these strains has been typical of the human biotype A. It should be stressed that some group of the examined strains showed at the same time the properties typical of staphylococcus of canine biotype E, such as: coagulation canine plasma (37.5%), beta hemolysin production (18.7%), the lack of the fibrinolysin production (12.5%) and the lack of the

protein A production (6.2%). All examined strains, in the specific way typical of the biotype E, did not produce urease, and 10 out of 16 strains (62.5%) – acetoin (Table 2).

Sensitivity to antibiotics

All examined strains occurred to be sensitive to antibiotics were used (penicillin, cephalothin, carbenicillin, erythromycin, clindamycin, doxycyclin, ciprofloxacin, vancomycin, gentamycin, cotrimoxazole, rifampicin, chloramphenicol, bacitracin, mupirocin, fusidic acid) (Fig. 6).

It is necessary to stress that they were sensitive to methicillin with the use of disc diffusion and the PCR methods (the lack of the gene *mec A*) (Fig. 4).

Phage typing

All strains showed only sensitivity to phage 187. These strains were never found to be susceptible to other phages from the basic set.

Amplification of *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, and *tst* genes

Of the 16 strains were tested, 15 (93.8%) had the *sec* gene. The PCR product had molecular mass approximately 450 pairs of bases (bp). One strain had both the *sec* gene and *seb* gene (PCR product 164 bp). Fifteen strains (93.8%) had the *tst* gene (PCR product 326 bp), and one strain which did not have the *tst* gene had the *sec* gene (Table 3, Fig. 1).

Table 3. Genotypic analysis of phage type 187 strains

Strain	Genes of toxins					Gene <i>mec</i>	Coagulase gene (<i>coa</i>) RFLP pattern (bp)	Protein A gene (<i>spa</i>) RFLP pattern (bp)	PFGE subtypes
	<i>sea</i>	<i>seb</i>	<i>sec</i>	<i>sed</i>	<i>tst</i>				
1	–	–	+	–	+	–	81, 162,405	140,170,307	A1
2	–	–	+	–	+	–	81, 162,405	140,170,307	A1
3	–	–	+	–	+	–	81, 162,405	140,170,307	A2
4	–	–	+	–	+	–	81, 162,405	140,170,307	A1
5	–	+	+	–	+	–	81, 162,405	140,170,307	B1
6	–	–	+	–	+	–	81, 162,405	140,170,307	A2
7	–	–	+	–	–	–	81, 162,405	140,170,307	A3
8	–	–	+	–	+	–	81, 162,405	140,170,307	A3
9	–	–	+	–	+	–	81, 162,405	140,170,307	A4
10	–	–	+	–	+	–	81, 162,405	140,170,307	A1
11	–	–	+	–	+	–	81, 162,405	140,170,307	A5
12	–	–	+	–	+	–	81, 162,405	140,170,307	A1
13	–	–	+	–	+	–	81, 162,405	140,170,307	A6
14	–	–	+	–	+	–	81, 162,405	140,170,307	A4
15	–	–	+	–	+	–	81, 162,405	140,170,307	A1
16	–	–	–	–	+	–	81, 162,405	140,170,307	A7
Total (%)	0	6.2	93.8	0	93.8	0	100	100	

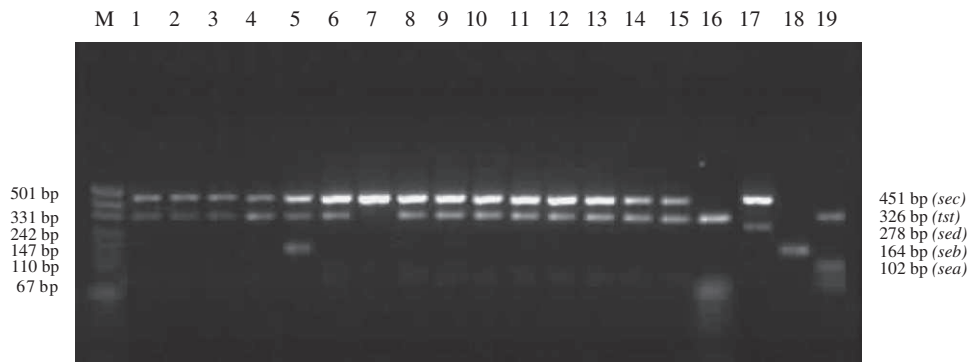


Fig. 1. Agarose gel electrophoresis of phage type 187 *S. aureus* strains of the amplified PCR fragments for the toxin genes (*sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *tst*). Lane M – molecular size marker (*pUC19DNA/MspI* enzyme, Fermentas); lanes 1–16 – strain numbers; lanes 1–4, 6, 8–15-(*sec*+/*tst*+) strains; lanes 5 – (*sec*+/*tst*+/*seb*+) strain; lane 7 – (*sec*+) strain; lane 16 – (*tst*+) strain. lane 17 – (*sec*+/*sed*+) control strain; lane 18 – (*seb*+) control strain; lane 19 – (*sea*+/*tst*+) control strain.

Amplification and restriction analysis of the coagulase gene

As a result of the amplification the homogenous products of the PCR reaction were obtained. The products constituted approximately 740 bp. The restriction analysis of these products with the use of the restriction enzyme *Alu I* allowed to differentiate three restriction fragments: 81, 162, 405 bp. All strains had the homogenous restriction patterns (Table 3, Fig. 2).

Amplification and restriction analysis of the protein A gene

Primers were derived from that part of the *spa* gene that encodes IgG-binding domains and were used for

amplification. As a result of the amplification the homogenous products (622 pb) of the reaction were obtained. Restriction with *HinfI* of the amplification products showed the presence of three restriction fragments: 140, 170 and 307 bp. All strains had the homogenous restriction patterns (Table 3, Fig. 3) (Fig. 4–6).

PFGE typing

The 16 *S. aureus* strains of phage type 187 were typed by PFGE. Two different PFGE types, designated from A to B were distinguished among strains (Fig. 5). The

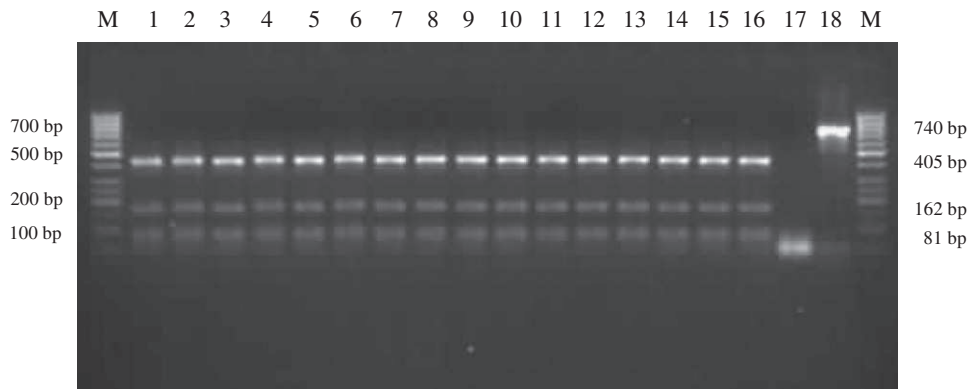


Fig. 2. Restriction enzyme digestion (*Alu I*) of PCR products of the *coa* gene from phage type 187 *S. aureus* strains. Lanes M – molecular size marker (*GeneRuler 50 bp DNA Ladder*, Fermentas); lanes 1–16 – *Alu I* restriction of PCR products for 16 strains of phage type 187; lane 17 – negative control of PCR; lane 18 – uncut PCR-amplified *coa* gene product.

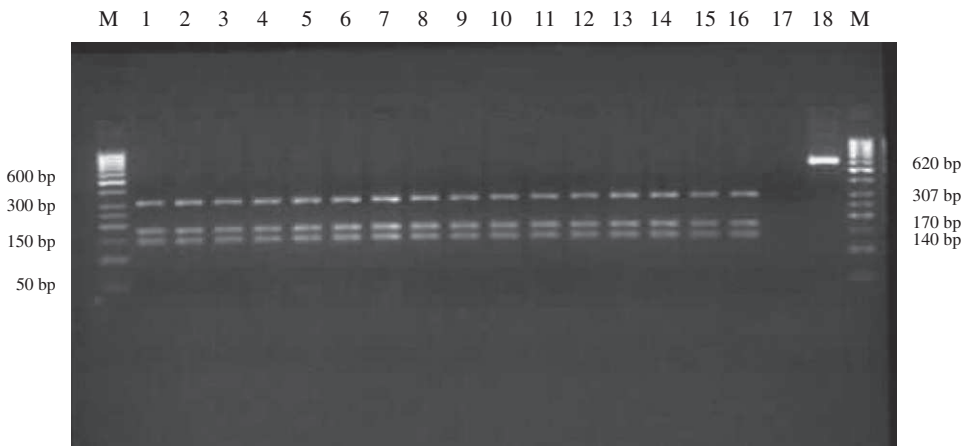


Fig. 3. Restriction enzyme digestion (*Hinf I*) of PCR products of the *spa* gene from phage type 187 *S. aureus* strains. Lanes M – molecular size marker (*GeneRuler 50 bp DNA Ladder*, Fermentas); lanes 1–16 – *Hinf I* restriction of PCR products for 16 strains of phage type 187; lane 17 – negative control of PCR; lane 18 – uncut PCR-amplified *spa* gene product.

most frequent PFGE type was A, characterized 15 of 16 isolates (93.8%). The PFGE type A was split into seven subtypes (A1–A7) that constitute one clone. The PFGE type B included only one strain of *S. aureus* (Fig. 5, Table 3). This strain was not genetic relation with the strains of PFGE type A and had both the *sec* gene and *seb* gene of enterotoxins.

Discussion

Previous investigation of various authors have shown that in phage type 187 there are strains having the properties typical of human and canine biotypes simultaneously (Kryński et al., 1981). Kryński et al. (1981) even postulated to classify the type 187 as a separate and independent biotype, intermediate between biotypes A and E staphylococci. In our experience this phenomenon (biotypes A/E) was related to two strains.

On the one hand these strains coagulated canine plasma, produced beta-hemolysin and fibrinolysin (as a staphylococci from biotype E) and on the other hand they utilized mannitol in anaerobic conditions, produced alpha-hemolysin and had negative reaction with cristal violet (as a staphylococci from biotype A). However basic properties of biotype A (according to Hájek and Maršálek, 1976) such as: mannitol fermentation, coagulation of human plasma, alpha hemolysin production, could induce to classify all the examined strains as a member of human biotype. Additionally, this is confirmed by the fact that they are isolated from human origin. The results of the genotyping with the use of digestion of chromosomal DNA with *Sma I* and separation of the DNA by PFGE showed that phage type 187 strains constitute one clone. Additionally, it was confirmed by the same restriction patterns with the use of PCR/RFLP method. Next, it was proved, that strains collected from different centers of Poland in the course

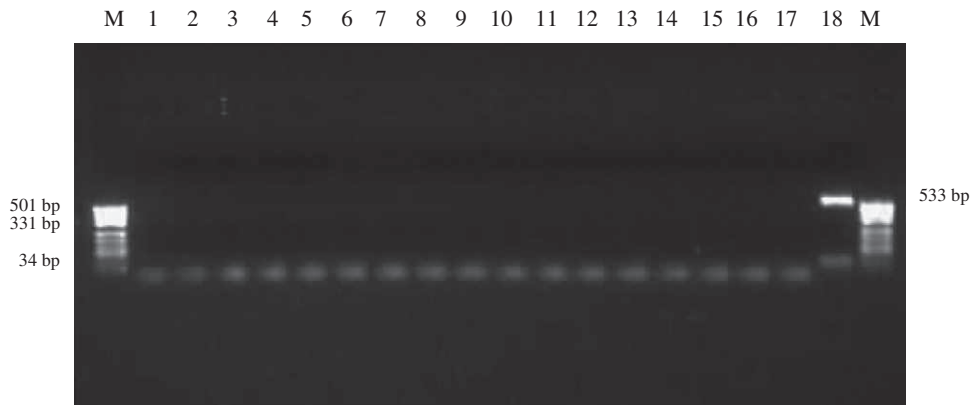


Fig. 4. Agarose gel electrophoresis of phage type 187 *S. aureus* strains of the amplified PCR fragments for the *mecA* gene. Lanes M – molecular size marker (*pUC19DNA/MspI enzyme*, Fermentas); lanes 1 to 16 – *mecA* (–) strains of phage type 187; lane 17 – negative control of PCR; lane 18 – *mecA* (+) control strain.

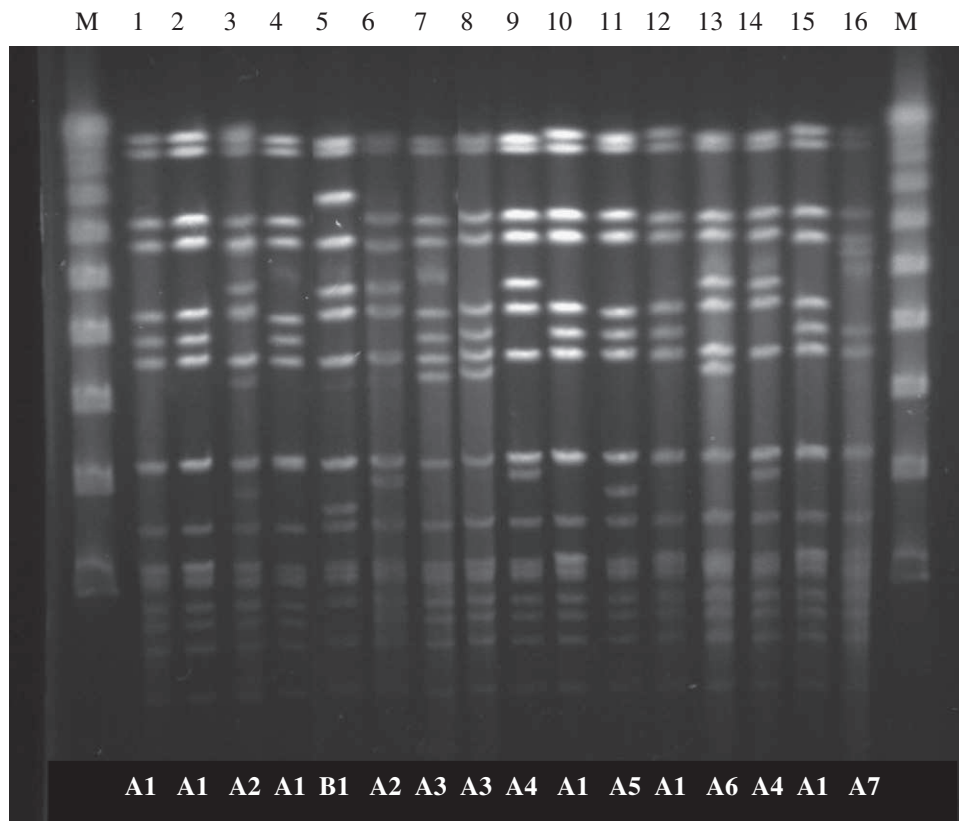


Fig. 5. PFGE image with the *SmaI* restriction pattern of the 16 phage type 187 *S. aureus* strains. Lanes 1–4 and lanes 6–16 – PFGE subtypes A1–A7, lane 5 – PFGE subtype B1. M – molecular size marker (*DNA-Lambda Ladder PFG Marker*, New England Biolabs, USA).

of several years constitute homogenous group not only with regard to phenotypic properties as a susceptibility to phage 187, but also with regard to genotypic ones.

None of the strains were resistant to methicillin or the other antibiotics tested for us, though the strains were isolated from various wards for several years. It is

known, that *S. aureus* strains of high sensitivity to antibiotics are rather rarely isolated from hospitalized patients (Matynia et al., 2005). It should be stressed that in the last years the resistance to methicillin of *S. aureus* strains has not shown increasing tendency which was involved probably with effective prevention of infections (Matynia et al., 2005).

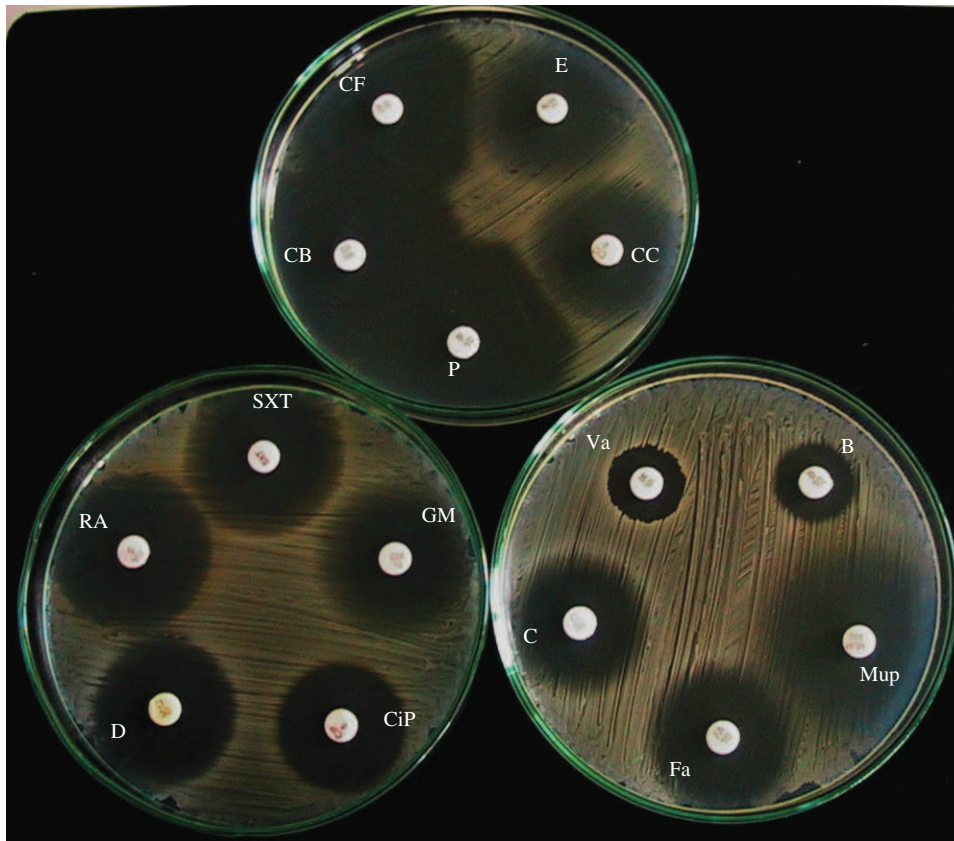


Fig. 6. Typical antibiogram of phage type *S. aureus* strains. Explanation of letters: P – penicillin, CB – carbenicillin, CF – cephalotin, E – erythromycin, CC – clindamycin, GM – gentamycin, CiP – ciprofloxacin, D – doxycycline, RA – rifampicin, SXT – trimethoprim-sulfamethoxazole, Va – vancomycin, B – bacitracin, Mup – mupirocin, Fa – fusidic acid, C – chloramphenicol.

S. aureus produced numerous virulence factors, including the enterotoxins or toxic shock syndrome toxin. These toxins are powerful superantigens that stimulate non-specific T-cell proliferation. In this study, a presence of genes of enterotoxins belonging to four different serotype groups were tested (SEA-SED). The research regarding the appearance of the enterotoxin genes among the strains of *S. aureus* isolated from people prove that about half of them have the enterotoxin genes (Hazariwala et al., 2002; Melconian et al., 1983), however, the enterotoxin gene A (*sea*) dominates and about 25% of them have the *tst* gene (Balaban and Rasooly, 2000; Mehrotra et al., 2000). Almost all of phage type 187 strains tested had genes of enterotoxin C and toxic shock syndrome toxin. Previous investigation of various authors have shown that the staphylococcus of phage type 187 differ from the typical representatives of *S. aureus*, as almost all of them have the enterotoxin gene, and this is the enterotoxin C gene (*sec*). Zschöck et al. (2000) found that the majority of the bovine strains of staphylococci had enterotoxin C gene. Similar strains from bovine and goat origins in Brazil were found by da Silva et al. (2005). It is very important to find out whether there is a relation between strains of phage type 187 and strains isolated from

animals and if so what is the reason for this relation. On the other hand enterotoxin C was a predominant type of enterotoxin produced by staphylococci isolated from foods (Rosec et al., 1997) as well as staphylococci isolated from human origin (Mempel et al., 2003).

The relation between sensitivity of *S. aureus* to the phages and the toxin production are well known. The epidemiological tests conducted with the use of the phages prove that certain phage types are more frequently isolated from a given type of infections than others. *S. aureus* causing the skin infections, such as the Staphylococcal Scalded Skin Syndrome (Ritter's disease) most frequently belongs to the phage type 71. The strains forming the enterotoxin most frequently belong to the III phage group, similarly to the staphylococcus of the phage type 29 participating in forming the TSST (Parker, 1983).

According to the results obtained by us, there is a question whether there is a relation between the sensitivity of phage 187 and the presence of the genes determining the formation of enterotoxins C and TSST-1 that can be a marker of the virulence of the examined strains. The data seem to show the necessity to examine the reason of such an analogy.

In conclusion, previous investigation of phage type 187 strains showed, that they constitute a group,

different from typical *S. aureus* strains with regard to sensitivity to phage 187, intermediate properties between biotypes A and E, and the serological ones (Kryński et al., 1976; Live, 1973). Our investigation proved additionally, that the strains of phage type 187 represented one clone of *S. aureus* with the presence of both: enterotoxin C and *TSST-1* genes which allows to consider them the strains of potentially high virulence.

Acknowledgment

We are very grateful to Waleria Hryniewicz from National Institute of Public Health, in Warsaw, Poland for providing toxin-producing *S. aureus* reference strains.

References

- Balaban, N., Rasooly, A., 2000. Staphylococcal enterotoxins. *Int. J. Food Microbiol.* 61, 1–10.
- Barski, P., Piechowicz, L., Galiński, J., Kur, J., 1996. Rapid assay for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using multiplex PCR. *Mol. Cel. Probes* 10, 471–475.
- Blair, J.E., Williams, R.E.O., 1961. Phage typing of *Staphylococci*. *WHO Bull.* 24, 771–778.
- da Silva, E.R., do Carmo, L.S., da Silva, N., 2005. Detection of enterotoxins A, B, and C genes in *Staphylococcus aureus* from goat and bovine mastitis in Brazilian dairy herds. *Vet. Microb.* 106, 103–107.
- De Lencastre, H., Couto, I., Santos, I., Melo-Cristino, J., Torres-Pereira, A., Tomasz, A., 1994. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* disease in a Portuguese hospital: characterization of clonal types by a combination of DNA typing methods. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 13, 64–73.
- Frenay, H.M.E., Bunschoten, A.E., Schouls, L.M., 1996. Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* on the basis of protein A gene polymorphism. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 15, 60–64.
- Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, second ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Goh, S.H., Byrne, S.K., Zang, J.L., Chow, W., 1992. Molecular typing of *Staphylococcus aureus* on the basis of coagulase gene polymorphisms. *J. Clin. Microbiol.* 30, 1642–1645.
- Hájek, V., Maršálek, E., 1976. Evaluation of classificatory criteria for staphylococci. In: Jeliaszewicz, J. (Ed.), *Staphylococci and Staphylococcal Infections*. S. Karger, Basel.
- Haque, R.V., Baldwin, N.J., 1964. Types of hemolysins produced by *Staphylococcus aureus*, as determined by the replica plating technique. *J. Bacteriol.* 88, 1442–1447.
- Hazariwala, A., Sanders, Q., Hudson, C.R., Hofacre, C., Thayer, S.G., Maurer, J.J., 2002. Distribution of staphylococcal enterotoxin genes among *Staphylococcus aureus* isolates from poultry and humans with invasive staphylococcal disease. *Avian Dis.* 46, 132–136.
- Kerr, S., Kerr, G.E., Mackintosh, C.A., Marples, R.R., 1990. A survey of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* affecting patients in England and Wales. *J. Hosp. Infect.* 16, 35–48.
- Kryński, S., Galiński, J., Becla, E., 1976. Phage type 187 as a separate taxonomic subunit within the *Staphylococcus aureus* species. In: *Staphylococcus and Staphylococcal Diseases*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York, pp. 56–61.
- Kryński, S., Becla, E., Pytasz, Z., Malanowski, J., 1981. Mass carrier state of *Staphylococcus aureus* type 187 (originating from dog) in a newborn ward. *Przeg. Epid. XXXV* (4), 517–520.
- Krzywińska, E., Piechowicz, L., Galiński, J., 1999. Prevalence of phage group II in *Staphylococcus aureus* human strains. *Med. Dośw. Mikrobiol.* 51, 25–30.
- Live, I., 1973. Relationship of antigen k to *Staphylococcus aureus* bacteriophage type 187, of humane and of canine origine. *Infect. Immun.* 7, 473–475.
- Matynia, B., Młodzińska, E., Hryniewicz, W., 2005. Antimicrobial susceptibility patterns of *Staphylococcus aureus* in Poland obtained by the National quality assurance programme. *Clin. Microb. Infect.* 11, 379–385.
- Mehrotra, M., Wang, G., Johnson, W.M., 2000. Multiplex PCR for detection of genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin 1, and methicillin resistance. *J. Clin. Microbiol.* 38, 1032–1035.
- Melconian, A.K., Brun, Y., Fleurette, J., 1983. Enterotoxin production, phage typing and serotyping of *Staphylococcus aureus* strains isolated from clinical materials and food. *J. Hyg. Camb.* 91, 235–242.
- Mempel, M., Lina, G., Hojka, M., Schnopp, C., Seidl, H.P., Schafer, T., Ring, J., Vandenesch, F., Abeck, D., 2003. High prevalence of superantigens associated with the *egc* locus in *Staphylococcus aureus* isolates from patients with atopic eczema. *Eur. J. Clin. Infect. Dis.* 22, 306–309.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1994. *Performance Standards of Antimicrobial Disc Susceptibility Test*. fifth ed. approved standard. *NCCLS*. Document M2-A5 Villanova, Pa.
- Parker, M.T., 1983. The significance of phage-typing patterns in *Staphylococcus aureus*. *Staphylococci and Staphylococcal Infect.* 1, 33–62.
- Piechowicz, L., Garbacz, K., Dajnowska-Stanczewska, A., Galiński, J., 2005. Phage types of *Staphylococcus aureus* isolated in Poland in 1999–2004. *Med. Dośw. Mikrobiol.* 57, 105–113.
- Rosec, J., Guiraud, J., Dalet, C., 1997. Enterotoxin production by *Staphylococci* isolated from foods in France. *Int. J. Food Microbiol.* 35, 213–221.
- Schwarzkopf, A., Karch, H., Schmidt, H., 1993. Phenotypical and genotypical characterization of epidemic clumping factor-negative, oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* 31, 2281–2285.
- Tenover, F.C., Arbeit, R.D., Goering, R.V., Mickelsen, P.A., Murray, B.E., Persing, D.H., Swaminathan, B., 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.* 33 (9), 2233–2239.
- Vogelsang, T.M., Wormnes, A., Östervold, B., 1962. Correlation between staphylococcal phage groups and some

- staphylococcal enzymes demonstrated by simple methods. *Acta Path. Microbiol. Scandinav.* 54, 218–224.
- Waller, J.R., Hodel, S.L., Nuti, R.N., 1985. Improvement of two toluidine blue *o*-mediated techniques for DNase detection. *J. Clin. Microbiol.* 21, 195–199.
- Zschöck, M., Botzler, D., Blöcher, S., Sommerhäuser, J., Hamann, H.P., 2000. Detection of genes for enterotoxins (*ent*) and toxic shock syndrome toxin-1 (*tst*) in mammary isolates of *Staphylococcus aureus* by polymerase-chain-reaction. *Int. Dairy J.* 10, 569–574.

Katarzyna Garbacz, Agata Dajnowska-Stanczewska, Lidia Piechowicz

WYSTĘPOWANIE WYBRANYCH GENÓW ENTEROTOKSYN I TOKSYNY WSTRZĄSU TOKSYCZNEGO TSST-1 WŚRÓD WRAŻLIWYCH I OPORNYCH NA METYCYLINĘ GRONKOWCÓW ŻŁOCISTYCH IZOLOWANYCH Z PRÓBEK MATERIAŁU KLINICZNEGO

Zakład Mikrobiologii Lekarskiej
p.o. Kierownika Zakładu: dr n. med. M. Dąbrowska-Szponar

Przebadano 210 szczepów wrażliwych i opornych na metycylinę gronkowców żłocistych izolowanych z próbek materiału klinicznego. Częstość występowania genu enterotoksyny A (*sea*) wśród MRSA wynosiła prawie 80% i była ponad czterokrotnie wyższa niż wśród MSSA ($p < 0,05$). Geny pozostałych enterotoksyn B, C i D (*seb*, *sec* i *sed*), zarówno wśród MRSA jak i MSSA, były wykrywane zdecydowanie rzadziej (poniżej 10%), a gen toksyny wstrząsu toksycznego (*tst*) z częstością około 15%.

Enterotoksyny gronkowcowe oraz toksyna wstrząsu toksycznego należą do egzotoksyn *Staphylococcus aureus* mających właściwości superantygenów. Mechanizm działania superantygenów w odróżnieniu od typowych antygenów polega na masowym nieswoistym pobudzeniu proliferacji limfocytów T i wydzielania cytokin. Wzrost stężenia cytokin w organizmie człowieka powoduje szereg niepożądanych objawów, prowadząc nawet do wstrząsu toksycznego. Stwierdzono zasadniczą różnicę w sposobie pobudzania limfocytów T przez superantygeny od antygenów konwencjonalnych, które z jednej strony łączą się bezpośrednio z cząsteczką MHC komórki prezentującej antygen (bez konieczności ich prezentacji) z drugiej zaś z odpowiednim receptorem na powierzchni limfocytu T, powodując ich pobudzenie (1,6).

Drugi aspekt chorobotwórczości enterotoksyn gronkowcowych dotyczy ich enteropatogenności. Enterotoksyny wytworzone przez gronkowce w produktach spożywczych wywołują u człowieka objawy zatrucia pokarmowego. Gronkowcowe zatrucia pokarmowe stanowią drugą, po wywołanych przez *Salmonella*, najczęstszą postać zatruc pokarmowych (6).

Obecnie znanych jest osiemnaście rodzajów enterotoksyn; pięć klasycznych poznanych najwcześniej SEA-SEE oraz trzynaście nowych (SEG, SEH, SEI, SEJ, SEK, SEL, SEM, SEN, SEO, SEP, SEQ, SER i SEU), z których J-U nazywane są domniemanymi (7,13). Za enterotoksyny uznaje się te, których właściwości wymiotne udowodniono w doświadczeniach na małpach (A-I), pozostałe noszą miano domniemanych (13). Mimo wyróżnienia dużej liczby nowych enterotoksyn ich obecność jest na ogół związana ze współwystępowaniem

z klasycznymi, które pozostają czterema najczęściej izolowanymi enterotoksynami (A-D) (5,14,18). W związku z tym również komercyjny lateksowy test SET RPLA, służy do rutynowego wykrywania czterech podstawowych enterotoksyn.

Niniejsza praca miała na celu zbadanie występowania genów czterech klasycznych enterotoksyn A-D (*sea-sea*) oraz toksyny wstrząsu toksycznego (*tst*) wśród szczepów gronkocistów złocistych wrażliwych i opornych na metycylinę izolowanych z próbek materiału klinicznego w naszym kraju.

MATERIAŁ I METODY

Szczepy bakteryjne. Do badań użyto 107 wrażliwych i 103 opornych na metycylinę szczepów *S. aureus* wyizolowanych w latach 1998 – 2005 od pacjentów 21 szpitali położonych na terenie Polski północnej (Gdańsk, Gdynia, Człuchów, Lębork, Kartuzy, Kościerzyna, Słupsk, Starogard Gdański, Tczew i Wejherowo). Każdy izolat pochodził z próbki materiału klinicznego pobranego od innego pacjenta.

W badaniach użyto następujących szczepów wzorcowych: *S. aureus* BM 57 (z Uniwersytetu Rockefellera w Nowym Yorku) do oznaczania metycylinooporności; *S. aureus* MIKROBANK 14.004 (z kolekcji NIZP) jako kontrola dodatnia obecności genów *tst* i *sea*, *S. aureus* 66 ZML jako kontrola dodatnia obecności genów *seb* i *sec* oraz *S. aureus* 5D ZML jako kontrola dodatnia *sed* (z kolekcji Zakładu Mikrobiologii Lekarskiej AMG). Szczepy badane oraz wzorcowe przechowywano na podłożu TSB z dodatkiem 15% glicerolu w temperaturze -70°C .

Izolację bakteryjnego DNA przeprowadzono według metodyki *Barskiego* i wsp. (4) odwirowując 1ml nocnej hodowli bulionowej (TSB, 18 godz. w 37°C), osad zawieszono w 200 μl 2% Triton X-100 w 2M NaCl i dodawano 5 μg lizostafiny (Sigma). Po dokładnym wymieszaniu, zawiesinę inkubowano (30 min w 37°C), dodawano 20 μg proteinazy K (Sigma) i inkubowano (15 min w 65°C). Zawiesinę chłodzono do temperatury pokojowej, dodawano 400 μl chloroform żelu (A&A Biotechnology), wortexowano i wirowano (8000rpm/min, 5min). Górną warstwę odciągano do probówki z 300 μl alkoholu izopropylowego i przechowywano przez noc (-20°C) w celu wytrącenia DNA. Próby odwirowano (12000 rpm/min 5 min), uzyskany osad przemywano (70% etanolem w temp. 4°C). Po ponownym odwirowaniu (12000 rpm/min 5 min) osad suszono (temp. pokojowa, 15min), zawieszano w 100 μl buforu TE (Serwa). Stężenie DNA mierzono spektrofotometrycznie (kalkulator DNA/RNA, Pharmacia Biotech.). Do reakcji PCR używano DNA rozcieńczonego jałową, dejonizowaną wodą, o stężeniu 5 ng/ μl .

Wykrywanie genu metycylinooporności (*mecA*) prowadzono zgodnie z metodyką *Barskiego* i wsp. (4).

Wykrywanie genów enterotoksyn A, B, C, D (*sea, seb, sec, sed*) i toksyny wstrząsu toksycznego (*tst*) prowadzono metodą multiplex PCR według *Mehrotra* i wsp. (16). Reakcję przeprowadzono w 50 μl mieszaniny, która zawierała: 5 μl bakteryjnego DNA (5 ng/ μl), 5 μl 10x buforu reakcyjnego (Fermentas), 1 μl 0,02 mM każdego startera (Genset Oligos), 5 μl 2 mM dNTP (każdy), 1 μl 2,5 U polimerazy Taq (Fermentas) oraz 33 μl dejonizowanej wody. Reakcję amplifikacji przeprowadzono na termocyklerze Perkin Elmer, zgodnie ze schematem: 94°C przez 5 min. oraz 35 cykli, zaczynając od 94°C przez

2 min, 57°C przez 2 min, 72°C przez 1 min, a w ostatnim cyklu dodatkowo 72°C przez 7 min. Wyniki reakcji analizowano na 2% żelu agarozowym w świetle UV.

O b l i c z e n i a s t a t y s t y c z n e. W celu określenia związku między zmiennymi jakościowymi stosowano test niezależności chi kwadrat, przyjmując poziom istotności $p=0,05$, przy wartości krytycznej chi kwadrat równej 3,841 (15).

WYNIKI

Badanie występowania genów wybranych toksyn metodą multiplex PCR wykazało, że prawie 80% szczepów MRSA cechowała obecność genu enterotoksyny A (*sea*), podczas gdy geny enterotoksyn *seb* i *sec* występowały zdecydowanie rzadziej (poniżej 10%), a gen *sed* nie pojawił się wcale. W przypadku szczepów MSSA częstość występowania genu *sea* była ponad czterokrotnie niższa niż wśród MRSA 17,8% ($p<0,05$). Geny pozostałych enterotoksyn (*seb*, *sec*, *sed*) występowały z częstością niższą niż 10%, chociaż nieco częściej niż wśród MRSA. U około 15% gronkowców zarówno MSSA i MRSA wykryto gen *tst* (Tabela I).

Tabela I. Występowanie genów toksyn wśród szczepów MSSA i MRSA

Szczepy	Liczba szczepów	Geny toksyn/ Liczba szczepów				
		<i>sea</i>	<i>seb</i>	<i>sec</i>	<i>sed</i>	<i>tst</i>
MSSA	107	19	9	8	1	17
MRSA	103	82	2	7	0	15
Ogółem	210	101	11	15	1	32

Badanie układów genów toksyn w obu grupach gronkowców dowodzi, że najczęściej występował gen *sea* wraz z *tst*, natomiast sporadycznie pojawiły się układy *seb/tst*, *seb/sec* oraz *seb/sec/tst* (Tabela II).

Tabela II. Występowanie układów genów toksyn wśród MSSA i MRSA

Szczepy	Liczba szczepów	Układy genów toksyn/ Liczba szczepów			
		<i>sea/tst</i>	<i>seb/tst</i>	<i>seb/sec</i>	<i>seb/sec/tst</i>
MSSA	107	8	2	1	2
MRSA	103	13	0	1	1
Ogółem	210	21	2	2	3

Analiza występowania genów toksyn wśród gronkowców izolowanych z poszczególnych materiałów klinicznych nie wykazała zależności pomiędzy wykrywanymi genami, a rodzajem zakażenia, z którego szczep wyizolowano (Tabela III).

DYSKUSJA

Enterotoksyny wytwarzane przez gronkowce złociste izolowane z produktów spożywczych różnią się od wytwarzanych przez gronkowce pochodzące od ludzi. Wśród pierwszych z nich zdecydowanie dominują enterotoksyny klasyczne, w szczególności A i D (1,6,17), podczas gdy wśród drugich mogą przeważać różne rodzaje (3,5,9,10,13). Gronkowce izolo-

Tabela III. Występowanie genów toksyn wśród szczepów *S. aureus* izolowanych z próbek materiału klinicznego

Miejsce pobrania materiału	Geny toksyn/ Liczba szczepów					Liczba próbek
	<i>sea</i>	<i>seb</i>	<i>sec</i>	<i>sed</i>	<i>tst</i>	
Rana	33	6	2	1	13	62
Rana oparzeniowa	22	0	1	0	3	35
Nos	15	1	1	0	1	31
Gardło	9	1	3	0	3	27
Drogi oddechowe	10	0	1	0	4	21
Czyrak	2	1	0	0	2	15
Krew	5	1	0	0	2	10
Inne	5	1	0	0	4	9

wane od nosicieli cechuje dominacja genów operonu *egc* (*seg*, *sei*, *sem*, *sen* i *seo*), natomiast izolowane od chorych hospitalizowanych, genu enterotoksyny A (*sea*) (3,13,14). Chociaż niekiedy częstość występowania genów enterotoksyn klasycznych i nowych jest podobna zarówno wśród *S. aureus* pochodzących od nosicieli jak i izolowanych z materiałów od pacjentów z zakażeniami gronkowcowymi (5,9)

Zdecydowanie częściej toksyny o charakterze superantygenów wykrywane są wśród gronkowców opornych na metycylinę niż wśród na nią wrażliwych; różnica ta może wynosić nawet 30% (odpowiednio 80% i 50%) (10,20). Nasze badania potwierdzają powyższą tezę w odniesieniu do enterotoksyny A, która zdecydowanie częściej występowała wśród szczepów MRSA. Jednak ustalony przez nas odsetek, sięgający prawie 80% jest rzadko spotykany. Istotny wydaje się fakt, że również *Woźniak* i *Krzysztoń* badający polskie szpitalne szczepy MRSA zarówno metodą multiplex PCR jak i odwrotnej aglutynacji lateksowej (RPLA) odnotowali bardzo dużą częstość występowania enterotoksyny A (nawet powyżej 90%) (12,21). Badania *Ławrynowicz-Paciorek* wykazały, że gronkowce izolowane od chorych hospitalizowanych w większości (powyżej 70%) cechowała obecność genu *sea*, jak również ponad 70% z nich było opornych na metycylinę (13).

W związku z powyższym można przypuszczać, że wysoka częstość detekcji genu *sea* wśród metycylinoopornych gronkowców złocistych jest specyfiką szczepów występujących na terenie naszego kraju i być może wiąże się z dominacją określonego typu kasety *SCCmec*. Kasety *SCCmec* (ang. staphylococcal cassette chromosome *mec*) oprócz genu metycylinooporności *mecA* niosą geny regulujące jego ekspresję oraz inne geny oporności jak również zjadliwości *S. aureus* (8,19). Opisane dotychczas cztery typy kaset *SCCmec* (I-IV) mają ścisły związek z występowaniem określonych genów toksyn gronkowcowych. Jak wynika z najnowszych doniesień, gronkowce należące do typu II *SCCmec* cechuje występowanie w wysokim odsetku genów *sec* i *tst*, do typu III – genów *sea* i *see*, a do typu IV genów *sea* i *seb* (10).

Wykrywanie genów enterotoksyn metodą PCR jest równoznaczne z wykrywaniem enterotoksyn metodą serologiczną (testem RPLA) w hodowli (11,14,17). W związku z tym wysoki odsetek detekcji genu *sea* wśród badanych przez nas MRSA pozwala uznać je za szczepy wysoce patogenne, które mogą wywoływać zakażenia o ciężkim przebiegu.

K. Garbacz, A. Dajnowska-Stanczewska, L. Piechowicz

OCCURRENCE OF SELECTED ENTEROTOXINS AND TOXIC SHOCK SYNDROME TOXIN GENES AMONG SENSITIVE AND RESISTANT TO METHICILLIN *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ISOLATED FROM CLINICAL SAMPLES

SUMMARY

The aim of study was to estimate frequency of occurrence of enterotoxins (*sea-sed*) and TSST-1 (*tst*) genes. One hundred seven methicillin-sensitive and one hundred three methicillin-resistant strains of *S. aureus* isolated from hospital patients in 21 medical centers, in majority from the region of Gdansk were examined. The presence of selected toxins genes was detected by multiplex PCR. The results showed that almost 80% of MRSA strains were positive for *sea* gene, in contrast to MSSA (17,8%). Both MSSA and MRSA strains were rarely positive for the presence of other enterotoxins genes *seb*, *sec*, *sed* (less than 10%) and a *tst* gene was detected in about 15% of them. No correlation between presence of the particular genes and clinical samples was observed.

PIŚMIENNICTWO

1. Balaban N, Rasooly A. Staphylococcal enterotoxins. Int J Food Microbiol 2000; 61: 1-10.
2. Bania J, Dabrowska A, Bystron J i inni. Distribution of newly described enterotoxin-like genes in *Staphylococcus aureus* from food. Int J Food Microbiol 2006; 108: 36-41.
3. Bania J, Dabrowska A, Korzekwa K i inni. The profiles of enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* from nasal carriers. Lett Appl Microbiol 2006; 42: 315-20.
4. Barski P, Piechowicz L, Galiński J i inni. Rapid assay for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using multiplex PCR. Mol Cell Probes 1996; 10: 471-5.
5. Becker K, Friedrich A, Lubritz G i inni. Prevalence of genes encoding pyrogenic toxin superantigens and exfoliative toxins among strains of *Staphylococcus aureus* isolated from blood and nasal specimens. J Clin Microbiol 2003; 41: 1434-9.
6. Dinges MM, Orwin PM, Schlievert PM. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. Clin Microbiol Rev 2000; 13: 16-34.
7. Holtfreter S, Bröker BM. Staphylococcal superantigens: do they play a role in sepsis?. Arch Immunol Ther Exp 2005; 53: 13-27.
8. Ito T, Katayama Y, Asada K i inni. Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome *mec* integrated in the chromosome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother 2001; 45: 1323-36.
9. Jarraud S, Peyrat MA, Lim A i inni. *egc*, A highly prevalent operon of enterotoxin gene, forms a putative nursery of superantigens in *Staphylococcus aureus*. J Immunol 2001; 166: 669-77.
10. Kim JS, Song W, Kim HS i inni. Association between the methicillin resistance of clinical isolates of *Staphylococcus aureus*, their staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) subtype classification, and their toxin gene profiles. Diag Microbiol Infect Dis 2006; 56: 289-95.
11. Klotz M, Opper S, Heeg K, Zimmermann S. Detection of *Staphylococcus aureus* enterotoxins A to D by real-time fluorescence PCR assay. J Clin Microbiol 2003; 41: 4683-7.
12. Krzysztoń-Russjan J. Struktura klonalna populacji *Staphylococcus aureus* opornych na metycylinę izolowanych w Polsce w latach 1996-2000. Praca doktorska, Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego 2004.

13. Ławrynowicz-Paciorek M, Kochman M, Piekarska K i inni. Występowanie enterotoksyn u szczepów *Staphylococcus aureus* izolowanych od chorych hospitalizowanych i nosicieli. *Med Dośw Mikrobiol* 2006; 58: 275-81.
14. Ławrynowicz-Paciorek M, Kochman M, Piekarska K i inni. The distribution of enterotoxin and enterotoxin-like genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from nasal carries and food samples. *Int J Food Microbiol* 2007; 117: 319-23.
15. Łomnicki A. Wprowadzenie do statystyki przyrodników. PWN W-wa 2003: 188.
16. Mehrotra M, Wang G, Johnson WM. 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: 1032-5.
17. Najera-Sanchez G, Maldonado-Rodriguez R, Ruiz OP, de la Garza LM. Development of two multiplex polymerase chain reactions for the detection of enterotoxigenic strains of *Staphylococcus aureus* isolated from foods. *J Food Prot* 2003; 66: 1055-62.
18. Okii K, Hiyama E, Takesue Y i inni. Molecular epidemiology of enteritis-causing methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Hosp Infect* 2006; 62: 37-43.
19. Oliveira DC, Tomasz A, de Lancastre H. Secrets of success of a human pathogen: molecular evolution of pandemic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet Infect Dis* 2002; 2: 180-9.
20. Tristan A, Ferry T, Durand G i inni. Virulence determinants in community and hospital methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Hosp Infect* 2007; 65: 105-9.
21. Woźniak G, Hryniewicz W. Wytwarzanie enterotoksyn A, B, C, D oraz toksyny wstrząsu toksycznego TSST-1 przez szczepy *Staphylococcus aureus* izolowane z zakażeń szpitalnych. Materiały naukowe XXIII Zjazdu Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów OŁ PTM Łódź 1996: 47.

Otrzymano: 17 VII 2007 r.

Adres Autora: 80-227 Gdańsk, ul. Do Studzienki 38, Zakład Mikrobiologii AM
e-mail: kasgba@amg.gda.pl