

Różnicowanie szczepów *Staphylococcus aureus* metodą PCR-fingerprinting

JOLANTA SACHANOWICZ**, ANTONI JAKUBCZAK***, MIROSŁAW KLECZKOWSKI*, ***

*Katedra Nauk Klinicznych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej SGGW, ul. Nowoursynowska 159c, 02-787 Warszawa

**Katedra Mikrobiologii Akademii Podlaskiej, ul. Prusa 12, 08-110 Siedlce

***Zakład Higieny Weterynaryjnej Oddział w Łomży, ul. Nowogrodzka 160, 18-410 Łomża

Sachanowicz J., Jakubczak A., Kleczkowski M.

Evaluating different *S. aureus* strains studied by DNA-fingerprinting

Summary

The aim of the study was a genomic comparison of *Staphylococcus aureus* isolates taken from humans, cows, dogs and food. A total of 48 *Staphylococcus aureus* strains were subtyped. PCR-fingerprinting was the method used to differentiate between the isolates. All the organisms in the study were fingerprinted using the *gfaseg4* primer. This method facilitated discriminating 7 different banding patterns from the 3-7 bands produced. The 48 isolates were grouped into seven different DNA-fingerprinting patterns: strains taken from humans designated to 6 patterns, strains taken from cows to 6 patterns, strains from dogs to 5 patterns, strains from food to 5 patterns. No relationship between strains from the same group was observed.

29 of the 48 strains (60 %) could be assigned to one of three DNA-fingerprinting groups. Three main DNA-fingerprinting groups were identified: group I consisting of 10 strains, group II consisting of 10 strains and group III with nine. The application of the DNA-fingerprinting method verifies differences in the DNA patterns of *S. aureus* strains from different origins.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, PCR-fingerprinting

Proces różnicowania szczepów *S. aureus* w obrębie danego gatunku jest bardzo istotny w dochodzeniach epidemiologicznych np. w przypadku zakażeń szpitalnych (1, 11), ustalaniu pokrewieństwa szczepów (22), różnicowaniu szczepów wirulentnych, potencjalnie wirulentnych lub komensalnych (2, 18). Powszechnie stosowane metody typowania drobnoustrojów opierają się głównie na badaniu cech morfologicznych, serologicznych i biochemicznych. Są to jednak niepełne metody ich identyfikacji. Jedynie analiza materiału genetycznego jednoznacznie określa zbiór cech charakterystycznych dla danego gatunku bakterii. Coraz częściej przedmiotem badań nad bakteriami będącymi czynnikami zachorowań ludzi i zwierząt jest ich chromosomalne i plazmidowe DNA. Perspektywiczną techniką szybkiego subtypowania jest analiza genomowego DNA metodą – fingerprinting (5, 11, 12, 19, 22). W metodzie tej starter jest wykorzystany do zaaplikowania przypadkowych, nieciągłych sekwencji chromosomalnego DNA. Ponieważ starter jest dowolny, nie wiadomo, które sekwencje w chromosomie będą skopiiowane. W określonych jednak warunkach, zawsze te same sekwencje są kopiowane, co pozwala wykorzystać tę metodę do określania identyczności szczepów oraz ich dróg rozprzestrzeniania

się w środowisku. Metoda DNA-fingerprinting przede wszystkim identyfikuje trwałe zmiany w genomie bakterii i z tego punktu widzenia jest techniką wskazującą w sposób znacznie doskonalszy różnice między szczepami bez względu na środowisko z jakiego pochodzą.

Celem badań było określenie zróżnicowania genomowego wśród szczepów *S. aureus* izolowanych z różnych źródeł przy wykorzystaniu techniki PCR-fingerprinting.

Materiał i metody

Materiał do badań stanowiło 48 szczepów *S. aureus* podzielonych na pięć grup. 10 szczepów wchodzących w skład pierwszej grupy wyizolowano z mleka krów dotkniętych kliniczną formą *mastitis*, 10 szczepów grupy drugiej pochodziło z ran pourazowych pacjentów Wojewódzkiego Szpitala w Łomży, 10 szczepów grupy trzeciej z materiału pobranego ze zmian chorobowych występujących na skórze psów, 10 szczepów grupy czwartej z próbek farszu mięsnego oraz wędlin. Oddzielną grupę stanowiło 8 szczepów *S. aureus* zakwalifikowanych do 4 biotypów (I, II, III, IV), po 2 szczepy w każdym biotypie.

Izolacji i oznaczenia szczepów *S. aureus* z grupy pierwszej dokonano według Instrukcji PIW w Puławach (7), z grupy drugiej i trzeciej metodą Kędzi (10), z grupy czwar-

tej według PN-94/A-82055-9 (16). Biotypowania badanych szczepów *S. aureus* szczepów dokonano według Umeki (20).

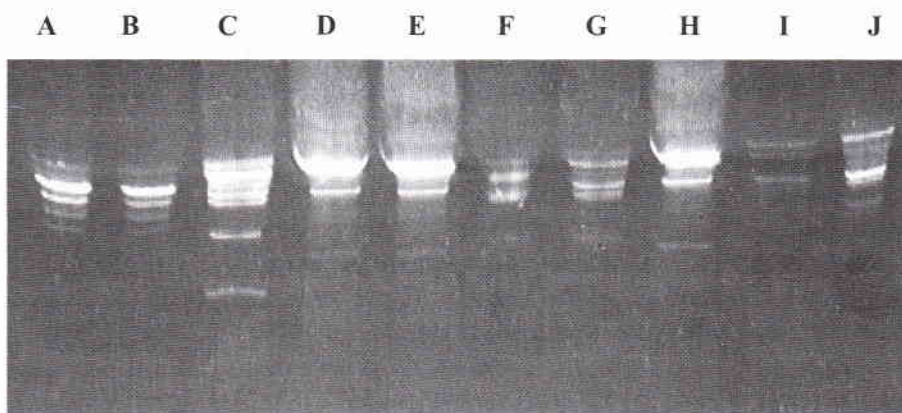
Izolacja genomowego DNA. Materiał wyjściowy stanowiły hodowle poszczególnych izolatów *S. aureus* namnożonych w bulionie BHI firmy Difco przez 24 h. Genomowe DNA izolowano z odwirowanej masy komórkowej wykorzystując zestaw Genomic DNA Prep Plus A & Biotechnology (Gdynia, Polska), stosując do lizy komórek enzym lizostafinę (Lysostaphin, Fluka nr kat. 62965). Izolację przeprowadzono zgodnie z procedurą podaną przez producenta.

PCR przeprowadzano w 50 µl objętości próby, w termocyklerze Perkin Elmer, model 2400. Dla każdego szczepu przeprowadzono co najmniej dwie reakcje PCR celem potwierdzenia powtarzalności wyniku.

Sprawdzono 4 startery: starter zastosowany do genotypowania *Acinetobacter* 5'-atggctactggcagcagc-3', starter zastosowany do genotypowania *E. coli* 5'-ttagctccctagatggg-3', startery zastosowane do genotypowania *Pseudomonas aeruginosa* i jako najlepiej różnicujący został wybrany starter gfaseq4 : 5'-cccactgtgggttcata-3'.

Skład mieszaniny reakcyjnej (50 µl) był następujący: DNA matrycowe (5 µl), bufor reakcji dla polimerazy Delta2 × 10:100 mM Tris-HCl (pH 8,8), 500 mM KCl, 20 mM MgCl₂, 1% Triton X-100 (5 µl), dNTPs: 2 mM każdy (5 µl), polimeraza DNA Delta2 (Pwo), DNA-Gdańsk (1 µl), starter: gfaseq4 – 10 µM (4 µl), woda dejonizowana (30 µl).

Warunki reakcji amplifikacji były następujące: wstępna denaturacja przez 2 min. w 93°C, 10 cykli – denaturacja przez 30 sek. w 93°C, przyłączenie startera przez 60 sek. w 33°C, wydłużanie nici DNA przez 60 sek. w 72°C. Następnie 30 cykli – denaturacja DNA przez 30 sek. w 93°C, dołączanie startera przez 30 sek. w 50°C, elongacja przez 40 sek. w 72°C i wydłużanie końcowe przez 2 min. w 72°C. Zawsze wykonywano kontrolę negatywną reakcji PCR. Próbkę kontroli negatywnej zawierała wszystkie składniki reakcji PCR z wyjątkiem matrycy DNA. Produkty reakcji rozdzielano elektroforetycznie w 8% żelu poliakrylamidowym



Ryc. 1. Rozdział elektroforetyczny w 8% żelu poliakrylamidowym produktów PCR uzyskanych z DNA szczepów *S. aureus*: A i B – profil nr 1, C – profil nr 2, D, E i H – profil nr 3, F – profil nr 4, G – profil nr 5, I – profil nr 6, J – profil nr 7

bufor TBE) zgodnie z ogólnie przyjętymi procedurami, przy napięciu 5 V/cm. Na żel наносzono od 5 do 20 µl mieszaniny reakcyjnej. Po elektroforezie żel wybarwiano przez 20 min. w wodzie zawierającej bromek etydyny o stężeniu 0,5 µg/ml.

Wyniki i omówienie

W wyniku reakcji amplifikacji otrzymano, niezależnie od źródła pochodzenia izolatu, bardzo zróżnicowane profile amplifikacyjne – 48 zbadanych szczepów *S. aureus* reprezentowało 7 profili amplifikacyjnych (ryc. 1). Liczba prążków DNA uzyskanych dla jednego izolatu wahała się od 3 do 7, 29 z 48 szczepów (ponad 60%) reprezentowało jeden z trzech dominujących profili, zawierających odpowiednio 10, 10 i 9 szczepów. Zakwalifikowanie poszczególnych szczepów do danego profilu przedstawia tab. 1.

Szczepy *S. aureus* pochodzące z żywności reprezentowały 5 profili amplifikacyjnych, z mleka od krów z mastitis – 6 profili, od psów – 5, od ludzi – 6, a stopień struktury profilu zamykał się odpowiednio w przedziale od 3 do 6, od 3 do 7, od 3 do 7, od 3 do 7 prążków. Produkty amplifikacji szczepów poddanych biotypowaniu reprezentowały 6 wzorów profili o różnych składach wzoru od 3 do 6 prążków.

Pomimo, że szczepy należały do tego samego biotypu dały różne wzory elektroforetyczne, po dwa wzory w każdym biotypie. Wzory dla izolatów biotypu pierwszego reprezentowały wzory elektroforetyczne o liczbie prążków 3 i 6, biotypu drugiego 7 i 3, biotypu trzeciego 5 i 6, biotypu czwartego 5 i 6.

4 szczepy *S. aureus* pochodzące od psów (40%) reprezentowały jeden wzór elektroforetyczny – nr 5, pozostałe z tej grupy występowały w 4 profi-

Tab. 1. Analiza wyróżnionych metodą PCR-fingerprinting profili DNA szczepów *S. aureus* w zależności od ich pochodzenia.

	Numer profilu						
	1	2	3	4	5	6	7
Pochodzenie szczepu	Liczba przynależnych szczepów do poszczególnych profili						
Mastitis	2	0	2	2	1	2	1
Ludzie	2	2	3	1	1	1	0
Psy	1	2	2	0	4	0	1
Żywność	3	0	2	0	1	2	2
Biotypy:							
I	0	0	0	1	1	0	0
II	0	0	1	0	0	1	0
III	1	0	0	0	1	0	0
IV	1	0	0	0	0	0	1

lach, odpowiednio w liczbie szczepów: 1, 2, 2 i 1. Szczepy z żywności reprezentowały pięć profili po 3, 2, 1, 2, i 2 szczepy w profilu. Szczepy od ludzi występowały w każdym z sześciu profili po 2, 2, 3, 1, 1 i 1. Szczepy pochodzące z mleka krów dotkniętych *mastitis* występowały w sześciu profilach po 2, 2, 2, 1, 2 i 1 w profilu.

Wzory elektroforetyczne nr 4 i 6 nie zawierały szczepów pochodzących od psów, wzór nr 2 nie zawierał szczepów z żywności i mleka, wzór nr 4 z żywności i od psów, nr 6 – od psów, nr 7 – od ludzi. Wzory nr 1, 3 i 5 zawierały szczepy ze wszystkich grup.

Wyniki badań wskazują na znaczne zróżnicowanie na poziomie genomowym szczepów *S. aureus*. Najprawdopodobniej wynika to z powodu różnych źródeł pochodzenia szczepów oraz ich adaptacji do środowiska bytowania.

Wyniki prac wielu autorów wskazują na przydatność techniki PCR-fingerprinting w subtypowaniu gronkowców (11). Lipman i wsp. (13) przeprowadzili genotypowanie metodą PCR-fingerprinting 71 szczepów *S. aureus* wyizolowanych z wymienia krów pochodzących ze stada ze stwierdzonym zakażeniem gronkowcowym. Otrzymane profile amplifikacyjne wykazały, że za zakażenia w stadzie odpowiedzialny był ten sam szczep *S. aureus*. Podobne wyniki otrzymał Lam i wsp. (11), którzy tą samą techniką PCR-fingerprinting wykazali, iż *mastitis* stwierdzone w 7 stadach krów wywołane zostało jednym dominującym szczepem *S. aureus*, co potwierdza teorię, że zapalenie wymienia na tle gronkowcowym jest wysoce zaraźliwe. Metodą tą udowodniono, że uporczywość infekcji wymienia krów spowodowanych przez *S. aureus* wynika z trudności eliminacji zakaźnego szczepu, który wywołał *mastitis*. Dowodem na to było stwierdzenie szczepów o takim samym genotypie wyizolowanych z 20 ćwiartek z ostrym zapaleniem wymienia na początku choroby i potem w 3 tygodniu po leczeniu (14). Metodą PCR-fingerprinting przeprowadzono badania 45 szczepów methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) wyizolowanych od 28 pacjentów i 12 pracowników szpitala, w którym wybuchła epidemia. Klonalne podobieństwo szczepów było wyraźne wobec czego zastosowano drastyczne metody izolacji zakażonych pacjentów i wyeliminowano nosicielstwo u pracowników szpitala co pozwoliło na zlikwidowanie epidemii (4).

Wyniki badania 77 szczepów *S. aureus* wyizolowanych od ludzi i ze środków spożywczych z użyciem 2 różnych starterów w 2 niezależnych badaniach, pozwoliły na określenie 10 profili DNA-fingerprinting o różnym stopniu pokrewieństwa (6). Natomiast Zhou i wsp. (22) użyli 3 różnych starterów w 3 niezależnych badaniach genotypowania 26 klinicznych szczepów i stwierdzili odpowiednio 9, 6 i 10 profili.

Reasumując należy stwierdzić, że zastosowanie metody DNA-fingerprinting pozwoliło na potwierdze-

nie występowania różnic w profilu DNA szczepów *S. aureus* pochodzących z różnych źródeł.

Piśmiennictwo

1. Cotter L., Lynch M., Cryan B., Fanning S.: Investigation of a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) outbreak in an Irish hospital: triplex PCR and DNA amplification fingerprinting. *J. Hosp. Inf.* 1997, 36, 37-47.
2. Crisostomo M. I., Westh H., Tomasz A., Chung M., Oliveira D. C., de Lencastre H.: The evolution of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: similarity of genetic backgrounds in historically early methicillin-susceptible and -resistant isolates and contemporary epidemic clones. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2001, 98, 9865-9870.
3. Danysz A.: Kompendium z farmakologii i farmakoterapii. VOLUMED, Wrocław 1998.
4. Fang F. C., McClelland M., Guiney D. G., Jackson M. M., Hartstein A. I., Morthland V. H., Davis C. E., McPherson D. C., Welsh J.: Value of molecular epidemiologic analysis in a nosocomial methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* outbreak. *JAMA*, 1993, 270, 1323-1328.
5. Fitzgerald J. R., Meaney W. J., Hartigan P. J., Smyth C. J., Kapur V.: Fine-structure molecular epidemiological analysis of *Staphylococcus aureus* recovered from cows. *Epidemiol. Infect.* 1997, 119, 261-269.
6. Fucyo J. M., Martin M. C., Gonzalez-Hevia M. A., Mendoza M. C.: Enterotoxin production and DNA fingerprinting in *Staphylococcus aureus* isolated from human and food sample. Relations between genetic types and enterotoxins. *Int. J. Food Microbiol.* 2001, 67, 139-145.
7. Grajewska P., Artecki E.: Diagnostyka laboratoryjna mastitis. Instytut Weterynarii CODKW, Puławy 1978.
8. Inglis B., El-Adhami W., Stewart P. R.: Methicillin-sensitive and -resistant homologues of *Staphylococcus aureus* occur together among clinical isolates. *J. Inf. Dis.* 1993, 167, 323-328.
9. Jakubczak A., Sachanowicz J., Kleczkowski M., Bukowski K.: Wpływ wybranych antybiotyków na wytwarzanie form L szczepów *Staphylococcus aureus*. *Medycyna Wet.* 2001, 58, 807-809.
10. Kędzia W.: Diagnostyka mikrobiologiczna w medycynie. PZWL, Warszawa, 1990.
11. Lam T. J., Lipman L. J., Schukken Y. H., Gaastra W., Brand A.: Epidemiological characteristics of bovine clinical mastitis caused by *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* studied by DNA fingerprinting. *Am. J. Vet. Res.* 1996, 57, 39-42.
12. Lencastre H. de., Severina E. P., Milch H., Thege M. K., Tomasz A.: Wide geographic distribution of a unique methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone in Hungarian hospitals. *Clin. Microbiol. Infect.* 1997, 3, 289-296.
13. Lipman L. J., de Nijs A., Lam T. J., Rost J. A., van Dijk L., Schukken Y. H., Gaastra W.: Genotyping by PCR, of *Staphylococcus aureus* strains, isolated from mammary glands of cows. *Vet. Microbiol.* 1996, 48, 51-55.
14. Myllys V., Ridell J., Bjorkroth J., Biese I., Pyoral S.: Persistence in bovine mastitis of *Staphylococcus aureus* clone as assessed by random amplified polymorphic DNA analysis, ribotyping and biotyping. *Vet. Microbiol.* 1997, 57, 245-251.
15. Power E. G., Anthony R. M., Kalenic S., French G. L.: Failure of bacteriophage typing to detect an inter-hospital outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Zagreb subsequently identified by random amplification of polymorphic DNA (RAPD) and pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). *Clin. Microbiol. Infect.* 1999, 5, 634-642.
16. PN-94/A-82055-9. Wykrywanie obecności i oznaczanie liczby *Staphylococcus aureus*.
17. Pujol M., Pena C., Pallares R., Ariza J., Ayats J., Dominguez M. A., Gudiol F.: Nosocomial *Staphylococcus aureus* bacteremia among nasal carriers of methicillin-resistant and methicillin-susceptible strains. *Am. J. Med.* 1996, 100, 509-516.
18. Trzcinski K., van Leeuwen W., van Belkum A., Grzesiowski P., Kluytmans J., Sijmons M., Verbrugh H., Witte W., Hryniewicz W.: Two clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Poland. *Clin. Microbiol. Infect.* 1997, 3, 198-207.
19. Trzcinski K., Hryniewicz W., Kluytmans J., van Leeuwen W., Sijmons M., Dulny G., Verbrugh H., van Belkum A.: Simultaneous persistence of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus* in a neonatal ward of a Warsaw Hospital. *J. Hosp. Inf.* 1997, 36, 291-303.
20. Umeke F., Otsuka G., Seki M., Yoshida M., Yosai A., Takeishi M.: Evaluation of acid production from carbohydrates and pathogenicity of *Staphylococcus aureus* in bovine quarter milk. *Milchwissenschaft* 1992, 48, 22-25.
21. Wei H. L., Chiou C. S.: Molecular subtyping of *Staphylococcus aureus* from an outbreak associated with a food handler. *Epidemiol. Infect.* 2002, 128, 15-20.
22. Zhou J., Guo S.: Molecular typing of *Staphylococcus aureus* with randomly amplified polymorphic DNA: Hunan Yi Ke Da Xue Xue Bao. 1999, 24, 17-19.

Adres autora: mgr Jolanta Sachanowicz, ul. Domanicka 29, 08-110 Siedlce