

Typowanie molekularne szczepów *Staphylococcus aureus* wyizolowanych z mleka krów chorych na mastitis*)

PAWEŁ NAWROTEK, JOLANTA KARAKULSKA, DANUTA CZERNOMYSY-FUROWICZ, JACEK BORKOWSKI, ANTONI J. FUROWICZ

Katedra Immunologii i Mikrobiologii Wydziału Biotechnologii i Hodowli Zwierząt AR, ul. Doktora Judyma 24, 71-466 Szczecin

Nawrotek P., Karakulska J., Czernomysy-Furowicz D., Borkowski J., Furowicz A. J.
Molecular typing of *Staphylococcus aureus* strains isolated from milk of mastitic cows

Summary

The aim of these studies was the clonal analysis of 48 *S. aureus* strains, isolated from milk samples from 48 cows with clinical and subclinical mastitis. Specific markers were detected using PCR: gap gene as the genus marker for *Staphylococcus* spp. and nuc gene as the species marker for *S. aureus*. Clonal typing of *S. aureus* isolates was carried out using RAPD-PCR with two primers simultaneously. Clonal relatedness was determined on the basis of the number and molecular mass of RAPD amplicons and analyzed using the unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) and Jaccard's similarity coefficient. On the basis of RAPD-PCR and clonal analysis employing the UPGMA method with Jaccard coefficient it was determined that all of the analyzed *S. aureus* strains were identical on the genome level. This indicates that only one bacterial clonal type was responsible for mastitis caused by *S. aureus* in the analyzed herd. This denotes that the virulence of *S. aureus* isolated from mastitis cases is very high, and that the elimination of this strain is very difficult. The research showed the usefulness of RAPD-PCR in interspecies *S. aureus* strains typization and the prospect of employing it in routine epidemiological diagnostics of mastitis in cows. The contribution of *S. aureus* strains representing one clonal type in the etiology of mastitis in cows from one herd was also confirmed.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, mastitis, RAPD-PCR, molecular epidemiology

Staphylococcus aureus stanowi jedną z najczęstszych przyczyn zapalenia wymienia krów (3, 5, 7, 18). Schorzenie to przyczynia się do obniżenia produkcji mleka i pogorszenia jego jakości. Profilaktykę i terapię mastitis utrudnia różnorodność czynników etiologicznych (9). Szczepy gronkowca złocistego są często izolowane z mleka krów z ostrą postacią zapalenia gruczołu mlekowego, najczęściej jednak od zwierząt nie wykazujących objawów klinicznych (1, 7). Zakażenia gronkowcowe są wynikiem inwazji bakterii do tkanek, a następnie ich toksycznej i/lub enzymatycznej aktywności (17). Wielu autorów podkreśla rolę, jaką w mastitis krów odgrywają wytwarzane przez te patogeny pirogenne egzotoksyny o właściwościach superantygenów, do których należą enterotoksyny gronkowcowe – SEs (staphylococcal enterotoxins) oraz toksyna zespołu wstrząsu toksycznego TSST-1 (toxic-shock syndrome toxin-1) (6, 7, 10, 22). Wykazano

także, iż zdolność do wytwarzania tych toksyn, zwłaszcza enterotoksyny C (SEC) i toksyny TSST-1, nie jest konieczna do wywołania mastitis (2, 26). Ze względu na specyficzną biologię gronkowca złocistego, niezmiernie ważną rolę odgrywa dokładne typowanie szczepów (typizacja klonalna), ułatwiające przeprowadzenie szerszych badań, w tym analizy czynników zjadliwości (15, 16, 18, 24). Stosując analizę klonalną można określić determinanty genetyczne opornych na preparaty przeciwbakteryjne szczepów *S. aureus*, a tym samym ustalić ich krążenie pomiędzy organizmami zwierząt i ludzi, ze wskazaniem na główny rezerwuuar tych drobnoustrojów (20).

Wiarygodna identyfikacja i różnicowanie szczepów gronkowców (także w obrębie gatunku) mają istotne znaczenie, zarówno z klinicznego, jak i epidemiologicznego punktu widzenia. Zastosowanie technik molekularnych, w tym testu RAPD-PCR (Randomly Amplified Polymorphic DNA-PCR) służącego do losowej amplifikacji fragmentów bakteryjnego DNA,

*) Badania finansowane ze środków na naukę w latach 2008-2009 jako projekt badawczy (Nr N N308 076834).

umożliwia przeprowadzenie dokładnej analizy genotypowej, znacznie zwiększającej potencjał diagnostyki bakteriologicznej, w tym gronkowca złocistego (8, 13-16).

Celem badań było przeprowadzenie analizy klonalnej (ustalenie pokrewieństwa genotypowego) szczepów *S. aureus* wyizolowanych z mleka krów chorych na *mastitis*.

Materiał i metody

Materiał stanowiło 48 szczepów *S. aureus*, wyizolowanych z mleka 48 krów rasy holsztyno-fryzyskiej z kliniczną lub podkliniczną postacią *mastitis*. Szczepy te pochodziły z kolekcji Katedry Immunologii i Mikrobiologii Akademii Rolniczej w Szczecinie. Przechowywano je w temp. -20°C w podłożu Tryptone Soya Broth (Oxoid) z 10% glicerolu.

Pochodzenie szczepów. Bakterie wyizolowano podczas badań prowadzonych od września do grudnia 2004 r., w wielkotowarowym gospodarstwie zlokalizowanym w województwie zachodniopomorskim. Stado liczyło 200 krów. Szczepy *S. aureus* były wyosobniane z mleka 48 krów na podstawie przeprowadzonego przez lekarza weterynarii testu TOK oraz oceny stanu klinicznego wymienia. Krowy były utrzymywane w systemie wolnostanowiskowym, z boksami do leżenia wyścielanymi trocinami, ze swobodnym dostępem do wody i paszy.

Izolacja i oczyszczanie materiału genetycznego. DNA z komórek bakteryjnych wyekstrahowano przy użyciu gotowego zestawu Genomic Mini AX Bacteria (A&A Biotechnology, Gdynia), po uprzednim rozmrożeniu i zwortekowaniu hodowli, a następnie zawieszeniu 50 μL hodowli w 1 mL Tryptone Soya Broth i inkubacji w 37°C przez 18 h.

Identyfikacja *S. aureus* przy użyciu PCR. Przynależność systematyczną badanych szczepów oznaczono na podstawie obecności specyficznych markerów genetycznych: rodzajowego – gap i gatunkowego – nuc. Fragment genu gap, kodującego białko wiążące transferynę oraz genu nuc, kodującego termostabilną nukleazę, amplifikowano przy użyciu starterów przygotowanych na podstawie prac Yugue-rosa i wsp. (23) oraz Wilsona i wsp. (21), zgodnie z warunkami reakcji podanymi przez tych autorów. Badania te realizowano według procedury przedstawionej we wcześniejszym opracowaniu (12).

Test RAPD-PCR. Charakterystyczny profil amplifikacyjny (RAPD) dla poszczególnych izolatów uzyskano przy użyciu starterów przygotowanych na podstawie pracy Reinoso i wsp. (16) oraz warunków PCR podanych przez tych autorów, a także w oparciu o własną optymalizację reakcji. Jako najlepiej różnicujące wybrano dwa 10-nukleotydowe startery: OLP11 (5'-ACGATGAGCC-3') i OLP13 (5'-ACCGCTGCT-3'), zawierające 60-70% par G-C i sekwencje niepalindromowe. Starterów użyto łącznie, w celu otrzymania większej liczby amplikonów oraz uzyskania powtarzalności wyników. Amplifikację prowadzono w mieszaninie reakcyjnej o objętości 20 μL , zawierającej: 10,60 μL wody dejonizowanej wolnej od nukleaz (Fermentas), 2 μL 10 \times stężonego buforu dla Taq polimerazy z $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2,8 μL MgCl_2 (3,5 mM), 2 μL każdego z dNTP (0,2 mM),

0,4 μL (2 U) rekombinowanej polimerazy Taq DNA (Fermentas), po 0,6 μL każdego ze starterów (IBB PAN) w stężeniu końcowym 3 μM oraz 1 μL roztworu genomowego DNA. Reakcje nastawiano na stanowisku do PCR – DNA/RNA UV-Cleaner, typ UVC/T-AR (Biosan). PCR przeprowadzano w termocyklerze Mastercycler personal (Eppendorf), przy zachowaniu następujących parametrów amplifikacji: denaturacja wstępna ($94^{\circ}\text{C}/5$ min.), 40 cykli składających się z: denaturacji ($93^{\circ}\text{C}/1$ min.), przyłączania starterów ($37^{\circ}\text{C}/1,5$ min.) i wydłużania ($72^{\circ}\text{C}/1$ min.) oraz końcowe wydłużanie starterów ($72^{\circ}\text{C}/8$ min.). Reakcję PCR przeprowadzano dwukrotnie, celem potwierdzenia powtarzalności wyników.

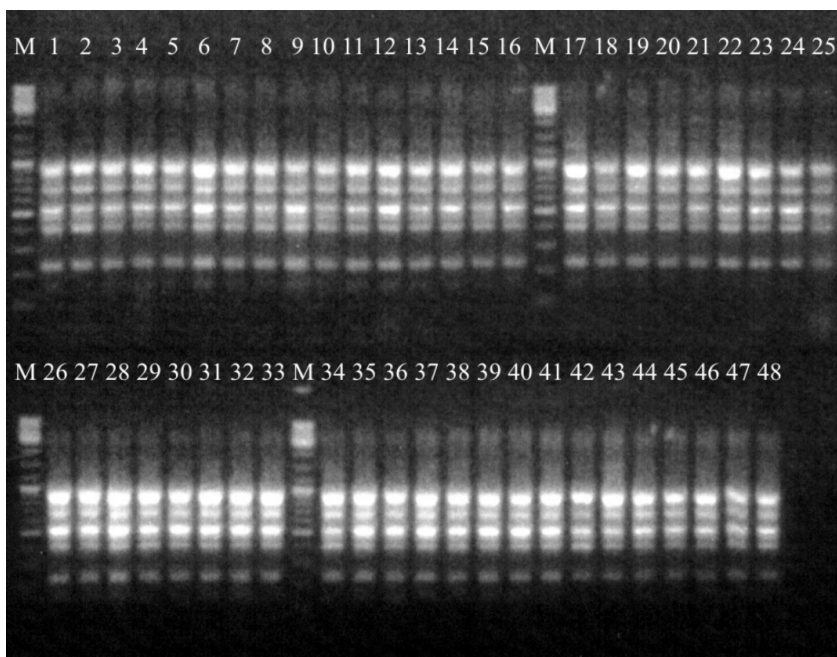
Detekcja produktów RAPD-PCR. Produkty amplifikacji rozdzielano elektroforetycznie w 1,5% żelu agarozowym (Prona), wybarwianym 1% wodnym roztworem bromku etydyny (Merck) (2,5 μL EtBr/80 mL żelu), w aparacie Sub-Cell GT Wide Mini z zasilaczem PowerPac Basic (Bio-Rad). Mieszaniny reakcyjne nanoszono na żel w ilości 12 μL , po uprzednim wymieszaniu z 2 μL 6 \times stężonego buforu obciążającego (Fermentas). Rozdział elektroforetyczny prowadzono w buforze 1 \times TBE (Bio-Rad), przy stałym napięciu 100 V (5 V/1 cm żelu) przez 60 min. Amplikony porównywano z markerem mas molekularnych O'GeneRuler™ DNA Ladder Mix (Fermentas) w zakresie 10 000-100 pz. Wyniki analizowano jakościowo i ilościowo oraz archiwizowano przy użyciu systemu do dokumentacji i analizy żeli – IG/LHR InGenius LHR (Syngene).

Analiza klonalna szczepów *S. aureus*. Pokrewieństwo genotypowe badanych szczepów oznaczano na podstawie liczby i masy molekularnej uzyskanych amplikonów RAPD, przy użyciu metody par skojarzonych z zastosowaniem średniej arytmetycznej (UPGMA – unweighted pair group method with arithmetic mean) oraz współczynnika podobieństwa Jaccarda, wykorzystując oprogramowanie GeneTools (Syngene).

Walidacja testu RAPD-PCR. Specyficzność i powtarzalność testu RAPD-PCR wykazano przeprowadzając reakcję z DNA referencyjnych szczepów *S. aureus* PCM 2054 i *S. aureus* PCM 502 (kolekcja PCM, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej we Wrocławiu). Każdorazowo wykonywano także reakcje RAPD-PCR bez matrycy DNA, stanowiące kontrole negatywne reagentów PCR.

Wyniki i omówienie

W wyniku reakcji RAPD-PCR, przeprowadzanej jednocześnie z dwoma starterami, każdorazowo uzyskiwano jeden powtarzalny wzór 6 produktów amplifikacji, o masie molekularnej w zakresie od 230 do 1000 pz. Zastosowane w teście RAPD-PCR startery, łącząc się losowo z mniej lub bardziej homologicznymi sekwencjami DNA szczepów *S. aureus*, utworzyły w wyniku amplifikacji, a następnie rozdziału elektroforetycznego, charakterystyczny układ prążków zdefiniowany jako „profil RAPD-PCR” (profil genotypowy szczepów gronkowca złocistego) (ryc. 1). Interpretacja wyniku rozdziału elektroforetycznego, polegająca na porównaniu położenia amplikonów względem markera mas molekularnych (GeneRuler™ DNA Ladder Mix), ocenie ich intensywności oraz analizie uzyska-



Ryc. 1. Obraz elektroforetyczny profili RAPD-PCR otrzymanych z produktów amplifikacji DNA analizowanych szczepów *S. aureus* wyizolowanych z mleka krów chorych na *mastitis*: M – marker mas molekularnych GeneRuler™ DNA Ladder Mix, w zakresie 10 000-100 pz; 1-48 – poszczególne ścieżki z profilami RAPD-PCR kolejnych analizowanych szczepów *S. aureus*

nych danych, pozwoliła na dokładną typizację badanych izolatów. Dużą wartość diagnostyczną techniki RAPD oraz jej zastosowanie w epidemiologii chorób zakaźnych, w tym *mastitis* na tle gronkowca złocistego, prezentowano w licznych opracowaniach (13-16, 24). Analiza obrazu elektroforetycznego produktów RAPD-PCR przeprowadzona metodą par skojarzonych (UPGMA) ze współczynnikiem podobieństwa Jaccarda, dowiodła, iż wszystkie analizowane szczepy *S. aureus* wykazały identyczność na poziomie genomu (wzajemna korelacja genotypowa na poziomie 100%). W świetle uzyskanych danych ustalono, że *mastitis* krów na tle gronkowca złocistego w badanym stadzie wywołane zostało przez jeden typ klonalny tej bakterii. Zbliżone wyniki uzyskali autorzy, którzy przy użyciu techniki PCR-fingerprinting przeprowadzali genotypowanie szczepów *S. aureus* wyizolowanych od krów pochodzących z jednego lub kilku stad (cyt. za 18). O epidemii *mastitis* u krów wywołanej przez jeden szczep gronkowca złocistego donosił również Smith i wsp. (cyt. za 5). Z kolei Sachanowicz i wsp. (18) zwrócili uwagę na znaczne zróżnicowanie na poziomie genomowym szczepów *S. aureus* pochodzących z tego samego źródła. Wskazują na to również wyniki badań Kuźmy i wsp. (5-7), którzy analizowali zróżnicowane szczepy gronkowca złocistego izolowane od krów chorych na *mastitis*, z tym że krowy te pochodziły z różnych stad.

Wykazana w badaniach własnych dominacja jednego szczepu gronkowca złocistego krążącego w analizowanym stadzie krów wskazuje na możliwość transmisji szczepów *S. aureus* z zakażonych ćwiartek wy-

mienia poprzez mleko na inne ćwiartki, wymiona, a następnie kolejne krowy (3). Świadczy to o wysokiej zaraźliwości gronkowca złocistego, wywołującego zapalenie gruczołu mlekowego u krów, co w bezpośredni lub pośredni sposób wykazywane jest przez wielu badaczy zajmujących się *mastitis* na tle gronkowcowym (1, 3, 5, 8, 15). Ponadto, obecność szczepów *S. aureus* o jednakowym genotypie stanowiących czynnik etiologiczny *mastitis* u krów pochodzących z jednego stada, izolowanych w okresie kilku miesięcy, może wskazywać na trudności w ich eliminacji. Potwierdzają to wyniki badań Myllys i wsp. (11), według których szczepy gronkowca złocistego o takim samym genotypie mogą być izolowane z mleka krów chorych na *mastitis*, zarówno przed leczeniem, jak i po jego zakończeniu.

Zmienność fenotypowa bakterii uzasadnia coraz częstsze wprowadzanie do diagnostyki *S. aureus* metod molekularnych, takich jak standardowy test PCR czy RAPD-PCR, znacznie ułatwiających detekcję oraz zwiększających stopień dyskryminacji szczepów izolowanych z tego samego lub różnych źródeł (4, 13, 16, 19, 25). Pereira i wsp. (15) stwierdzają nawet, że typowanie molekularne szczepów *S. aureus* jest niezbędne do prawidłowego przeprowadzenia procesu diagnostycznego. Przedstawiona w niniejszej pracy procedura badawcza, oparta na teście RAPD-PCR, jednoznacznie wskazuje na jego przydatność do wewnątrzgatunkowej typizacji szczepów gronkowca złocistego oraz możliwość zastosowania w rutynowej diagnostyce epidemiologicznej zapalenia gruczołu mlekowego u krów. Wykonane badania potwierdzają także udział jednego typu klonalnego szczepów *S. aureus* w etiologii *mastitis* u krów utrzymywanych w jednym stadzie. Na dominującą rolę szczepów *S. aureus* reprezentujących takie same genotypy w wywoływaniu zapalenia gruczołu mlekowego wskazują także inni autorzy (5, 8, 18).

Piśmiennictwo

1. Bystróż J., Kosek-Paszowska K., Molenda J.: Występowanie gronkowców enterotoksycznych w mleku surowym. *Medycyna Wet.* 2001, 57, 645-648.
2. Furowicz A. J., Borkowski J., Ferlas M.: Toxic-shock syndrome with special regard to clinical aspects in animals. *Adv. Agric. Sci.* 2004, 9, 23-32.
3. Kłossowska A., Malinowski E., Kuźma K.: Zależność liczby komórek somatycznych w mleku zatokowym krów z *mastitis* od bakteryjnego czynnika etiologicznego. *Medycyna Wet.* 2005, 61, 53-57.
4. Krawczyk B.: Diagnostyka molekularna w zakażeniach szpitalnych. *Post. Mikrobiol.* 2007, 46, 367-378.
5. Kuźma K., Malinowski E., Lassa H., Kłossowska A.: Analysis of protein A gene polymorphism in *Staphylococcus aureus* isolates from bovine *mastitis*. *Bull. Vet. Inst. Pulawy* 2005, 49, 41-44.
6. Kuźma K., Malinowski E., Lassa H., Kłossowska A.: Detection of genes for enterotoxins and toxic shock syndrome toxin-1 in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine *mastitis*. *Bull. Vet. Inst. Pulawy* 2003, 47, 419-426.
7. Kuźma K., Malinowski E., Lassa H., Kłossowska A.: Wytwarzanie enterotoksyn oraz toksyny zespołu wstrząsu toksycznego przez szczepy *Staphylococcus aureus* izolowane z *mastitis* u krów. *Medycyna Wet.* 2005, 61, 282-285.

8. Lam T. J., Lipman L. J., Schukken Y. H., Gastra 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.
9. Malinowski E.: Zapalenia wymienia a zaburzenia płodności u krów. *Medycyna Wet.* 2004, 60, 793-797.
10. Matsunaga T., Kamat S. I., Kakiichi N., Uchida K.: Characteristics of *Staphylococcus aureus* isolated from peracute and chronic bovine mastitis. *J. Vet. Med. Sci.* 1993, 55, 297-300.
11. Myllys V., Ridell J., Bjorkroth J., Biese I., Pyorala 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.
12. Nawrotek P., Borkowski J., Karakulska J., Furowicz A.: Test do szybkiego wykrywania szczepów *Staphylococcus aureus* w surowym mleku krowim. *Mat. konf.: Zoonozy – aktualne zagrożenia.* SGGW, Warszawa 2006, s. 69.
13. Olorunfemi O. B., Onasanya A. A., Adetuyi F. C.: Genetic variation and relationship in *Staphylococcus aureus* isolates from human and food samples using random amplified polymorphic DNAs. *Afr. J. Biotechnol.* 2005, 4, 611-614.
14. Osek J.: Zastosowanie metody losowej amplifikacji DNA techniką PCR w typowaniu molekularnym bakterii. *Medycyna Wet.* 2003, 59, 10-14.
15. Pereira M. S. V., Leal N. C., Leal T. C. A., Sobreira M., de Almeida A. M. P., Siqueira-Júnior J. P., Campos-Takaki G. M.: Typing of human and bovine *Staphylococcus aureus* by RAPD-PCR and ribotyping-PCR. *Lett. Appl. Microbiol.* 2002, 35, 32-36.
16. Reinoso E., Bettera S., Frigerio C., DiRenzo M., Calzolari A., Bogni C.: RAPD-PCR analysis of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine and human hosts. *Microbiol. Res.* 2004, 159, 245-255.
17. Rodgers J. D., McCullagh J. J., McNamee P. T., Smyth J. A., Ball H. J.: Comparison of *Staphylococcus aureus* recovered from personnel in a poultry hatchery and in broiler parent-farms with those isolated from skeletal disease in broilers. *Vet. Microbiol.* 1999, 69, 189-198.
18. Sachanowicz J., Jakubczak A., Piechota M.: Właściwości fenotypowe i genotypowe szczepów *Staphylococcus aureus* wyizolowanych z mleka krów chorych na mastitis. *Medycyna Wet.* 2005, 61, 1370-1373.
19. Tenover F. C., Weigel L. M., Appelbaum P. C., McDougal L. K., Chaitram J., McAllister S., Clark N., Killgore G., O'Hara C. M., Jevitt L., Patel J. B., Bozdogan B.: Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolate from a patient in Pennsylvania. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004, 48, 275-280.
20. Turutoglu H., Ercelik S., Ozturk D.: Antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci isolated from bovine mastitis. *Bull. Vet. Inst. Pulawy* 2006, 50, 41-45.
21. Wilson I. G., Cooper J. E., Gilmour A.: Detection of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in dried skimmed milk: use of the polymerase chain reaction for amplification and detection of staphylococcal enterotoxin genes entB and entC₁ and the thermonuclease gene nuc. *Appl. Environ. Microbiol.* 1991, 57, 1793-1798.
22. Younis A., Krifucks O., Heller E. D., Samra Z., Glickman A., Saran A., Leitner G.: *Staphylococcus aureus* exosecretions and bovine mastitis. *J. Vet. Med.* 2003, 50, 1-7.
23. Yugueros J., Temprano A., Berzal B., Sánchez M., Hernanz C., Luengo J. M., Naharro G.: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-encoding gene as a useful taxonomic tool for *Staphylococcus* spp. *J. Clin. Microbiol.* 2000, 38, 4351-4355.
24. Zadoks R. N., Schukken Y. H.: Use of molecular epidemiology in veterinary practice. *Vet. Clin. Food Anim.* 2006, 22, 229-261.
25. Zdzałik D., Dominiak A., Gałkowska H., Interewicz B., Olszewski W. L., Stelmach E., Luczak M., Machowski Z.: Charakterystyka molekularna szczepów *Staphylococcus aureus* i *Staphylococcus epidermidis* wyizolowanych z materiału klinicznego. *Med. Dośw. Mikrobiol.* 2006, 58, 269-274.
26. Zschoeck M., Riße K., Sommerhäuser J.: Occurrence and clonal relatedness of sec/tst positive *Staphylococcus aureus* isolates of quartermilk samples of cows suffering from mastitis. *Lett. Appl. Microbiol.* 2004, 38, 493-498.

Adres autora: dr inż. Paweł Nawrotek, ul. Chopina 51/5, 71-450 Szczecin;
e-mail: pawel.nawrotek@biot.ar.szczecin.pl