

Received: 2008.05.18  
Accepted: 2008.06.20  
Published: 2008.06.30

## Różnicowanie izolatów *Staphylococcus aureus* w oparciu o cechy fenotypowe\*

### Differentiation of *Staphylococcus aureus* isolates based on phenotypical characters

Jacek Międzobrodzki<sup>1</sup>, Natalia Małachowa<sup>1</sup>, Tomasz Markiewski<sup>1</sup>,  
Anna Białecka<sup>2</sup>, Andrzej Kasprówicz<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Zakład Mikrobiologii, Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii, Uniwersytet Jagielloński w Krakowie

<sup>2</sup> Centrum Badań Mikrobiologicznych i Autoszczepionek im. dra Jana Bobra w Krakowie

#### Streszczenie

Nieodzownym postępowaniem w monitorowaniu przenoszenia bakterii gatunku *Staphylococcus aureus* między nosicielami i w epidemiologii jest typowanie wyodrębnionych izolatów. Ocena poziomu pokrewieństwa między izolatami zależy od czynników epidemiologicznych i jest możliwa dzięki klonalnemu charakterowi gatunku *S. aureus*. Skuteczne typowanie unaocznia schemat przenoszenia się zakażenia na ograniczonym obszarze, umożliwiającą identyfikację rezerwuaru drobnoustrojów i wspomagającą skuteczność eradykacji. W pracy przedstawiono wiele metod typowania stosowanych w analizach zależności epidemiologicznych oraz w identyfikacji szczepów z gatunku *S. aureus*. Opisano następujące metody typowania: biotypowanie, serotypowanie, typowanie bakteriofagowe, antybiogram, elektroforezę białek, profil białek komórkowych, immunoblotting, metodę MLEE (multilocus enzyme electrophoresis), zmotypowanie oraz standardową metodę identyfikacji gatunkowej *S. aureus* stosowaną w laboratorium diagnostycznym. Przegląd obejmuje metody fenotypowania izolatów *S. aureus* stosowane w przeszłości i współcześnie w badaniach epidemiologicznych oraz w analizach współzależności między nimi. Przedstawione w pracy metody wykorzystują cechy morfologiczne, właściwości fizjologiczne i struktury chemiczne bakterii jako kryteria do typowania. Dokładność tych standardowych metod nie zawsze jest satysfakcjonująca, np. opisywanych ostatnio szczepów *S. aureus* o nietypowych cechach biochemicznych. Wobec powyższego wydaje się, że niezależnie od stosowanych metod fenotypowych rysuje się potrzeba wprowadzenia uzupełniających metod typowania genetycznego wykorzystujących metody biologii molekularnej.

Słowa kluczowe:

*Staphylococcus aureus* • metody fenotypowe • diagnostyka bakteriologiczna

#### Summary

Typing of *Staphylococcus aureus* isolates is a necessary procedure for monitoring the transmission of *S. aureus* among carriers and in epidemiology. Evaluation of the range of relationship among isolates rely on epidemiological markers and is possible because of the clonal character of *S. aureus* species. Effective typing shows the scheme of transmission of infection in a selected area, enables identifying the reservoir of the microorganism, and may enhance effective eradication. A set of typing methods for use in analyses of epidemiological correlations and the identification of *S. aureus* isolates is presented. The following methods of typing are described: biotyping, serotyping, antibiogram, protein electrophoresis, cell protein profiles (proteom), im-

\* Praca zrealizowana w ramach grantu nr PBZ-KBN-101/T09/2003/14.

munoblotting, multilocus enzyme electrophoresis (MLEE), zymotyping, and standard species identification of *S. aureus* in the diagnostic laboratory. Phenotyping methods for *S. aureus* isolates used in the past and today in epidemiological investigations and in analyses of correlations among *S. aureus* isolates are presented in this review. The presented methods use morphological characteristics, physiological properties, and chemical structures of the bacteria as criteria for typing. The precision of these standard methods is not always satisfactory as *S. aureus* strains with atypical biochemical characters have evolved recently. Therefore it is essential to introduce additional typing procedures using molecular biology methods without neglecting phenotypic methods.

**Key words:** *Staphylococcus aureus* • phenotypic methods • bacteriological diagnostics

**Full-text PDF:** <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=863418>

**Word count:** 2405

**Tables:** 1

**Figures:** –

**References:** 46

**Adres autora:** dr hab. Jacek Międzobrodzki, Zakład Mikrobiologii, Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii, Uniwersytet Jagielloński, ul. Gronostajowa 7, 30-387 Kraków; e-mail: jacekmi@mol.uj.edu.pl

## WPROWADZENIE

Bakterie z gatunku *Staphylococcus aureus* (gronkowiec złocisty) są wszechobecne w biosferze. Kolonizują one różne środowiska, ale rezerwuarem ich są ludzie i zwierzęta, gdyż gronkowce rozmnażają się tylko w wyższych organizmach. U zdrowych ludzi stanowią one główny składnik mikroflory prawidłowej skóry i błon śluzowych, ale mogą także być przyczyną zakażeń endogennych lub egzogennych u osobników z predyspozycją do zakażenia. Jest to podstawą zaliczenia tych bakterii do tzw. mikroflory oportunistycznej lub względnie komensalnej. Gatunek *S. aureus* stanowi obecnie także jeden z głównych czynników etiologicznych zakażeń szpitalnych. Na początku lat sześćdziesiątych dwudziestego wieku po raz pierwszy w Europie odnotowano epidemie powodowane przez metycylooporne szczepy tego gatunku (methicillin resistant *Staphylococcus aureus* – MRSA), aby wkrótce rozprzestrzenić się na cały świat i urosnąć do rangi globalnego problemu epidemiologicznego. Oporność szczepów MRSA na wiele różnych leków, ale przede wszystkim ich oporność na działanie antybiotyków beta-laktamowych (penicylinowych) uczyniły zakażenia powodowane przez te szczepy niebywale trudne i kosztowne w leczeniu [12,17,37]. Z tego względu tak dużą wagę przywiązuje się obecnie do lokalizacji źródeł zakażeń i kontroli rozprzestrzeniania się szczepów MRSA.

Czynnik etiologiczny powodujący epidemię infekcji wywodzi się od pojedynczej komórki, której potomstwo jest genetycznie identyczne lub blisko spokrewnione z organizmem źródłowym (tzw. charakter klonalny czynnika etiologicznego). Mikroorganizmy, które są klonalnie pokrewne mają takie same czynniki wirulencji, cechy biochemiczne oraz właściwości genomowe. Jednakże w obrębie gatunku *S. aureus* obserwuje się dużą różnorodność wśród występujących organizmów, które izolowane z różnych źródeł w różnym czasie oraz z różnych obszarów geograficznych można zakwalifikować do wielu różnych typów lub szczepów.

Typowanie bakteryjnych izolatów lub podgatunków (subspeciation) jest niezbędnym narzędziem w kontroli rozprzestrzeniania się nosicielstwa szczepów *S. aureus* oraz w badaniu epidemii. Ze względu na klonalny charakter rozprzestrzeniania się zakażeń bakteriami gatunku *S. aureus* niezmiernie istotne jest określenie stopnia pokrewieństwa analizowanych izolatów klinicznych na podstawie markerów epidemiologicznych. Właściwie dobrana metoda typowania pozwala na uzyskanie obrazu transmisji zakażeń na badanym obszarze oraz umożliwia znalezienie źródła pochodzenia danego ustroju i tym samym prowadzi do jego skutecznej eradykacji. W trakcie długo trwającej rywalizacji człowieka z gronkowcem złocistym opracowano wiele metod typowania, określających korelacje epidemiologiczne szczepów *S. aureus* oraz identyfikacji szczepów należących do tego gatunku. Historycznie pierwsze zostały opracowane metody fenotypowe oparte na prezentowanych przez bakterie cechach będących wynikiem ekspresji genów oraz poniekąd oddziaływania środowiska zewnętrznego. W pracy przedstawiono metody fenotypowania szczepów *S. aureus*, które były – a niektóre z nich są nadal – stosowane w dochodzeniach epidemiologicznych oraz badaniach korelacji wśród szczepów gronkowca złocistego.

## BIOTYPOWANIE

W badaniach epidemiologicznych lub ekologicznych, w celu precyzyjnego określenia źródła szczepu i drogi jego rozprzestrzeniania się, może zaistnieć potrzeba podania dokładniejszej charakterystyki analizowanych szczepów i podzielenia ich na jeszcze mniejsze jednostki systematyczne. System biotypowania pozwala na różnicowanie szczepów *S. aureus* ludzkich i zwierzęcych w poszczególne biotypy i warianty ekologiczne (ecovars). Biotypowanie opiera się na czterech podstawowych reakcjach: reakcji wytwarzania stafylokinazy,  $\beta$ -hemolizyny, koagulacji osocza bydlęcego oraz typie wzrostu pojedynczych kolonii na agarze z fiolet-

tem krystalicznym [11]. Inny system zaproponowany przez Brytyjczyków sugerował podział gronkowców złocistych na sześć biotypów oznaczonych literami od A do F. Podstawą tego podziału są różnice w wytwarzaniu metabolitów, takich jak stafylokinaza (fibrynolizyna), pigment, hemolizyna alfa i beta, czynnik zlepiania (clumping factor), zdolność wykrzepiania osocza ludzkiego lub wołowego, wzrost na agarze z fioletem krystalicznym, możliwość typowania zestawem fagów, a także pochodzenie izolatu [20].

## SEROTYPOWANIE

Immunologiczna analiza antygenów powierzchniowych komórki, czyli metoda serotypowania szczepów *S. aureus* jest najpowszechniej wykorzystywana do określania typu serologicznego otoczki oraz typu koagulazy [39]. Mimo że zidentyfikowano 11 typów otoczkowych dla gatunku *S. aureus*, aż 85–90% klinicznych izolatów MRSA należy do 5 lub 8 serotypu otoczkowego [45]. Tak więc metoda ta ma niską siłę różnicującą i stosowana jest tylko w Japonii [25]. Pomimo to typowanie serologiczne może być metodą uzupełniającą do innych metod typowania szczepów *S. aureus*. U bakterii tych znanych jest obecnie ponad trzydzieści aglutynogenów (występujących na powierzchni komórki różnych determinant antygenowych wielocukrowych i białkowych). W oparciu o te aglutynogeny stosuje się dwie metody typowania serologicznego: metodę Oedinga i Haukenesa oraz metodę Pilleta [20]. W obu tych metodach bada się aglutynację szczepów z surowicami typowymi lub wzorcowymi. W pierwszej metodzie zastosowanie znajduje czternaście surowic wzorcowych. Wychodząc z założenia, że każdy szczep ma na swej powierzchni kilka aglutynogenów, może być aglutynowany przez kilka surowic. W ten sposób uzyskuje się wzór serologiczny dla pojedynczego szczepu. Druga metoda – Pilleta, opiera się też na około czternastu surowicach typowych, z których każda aglutynuje szczep tylko jednego typu. Niewątpliwą zaletą typowania serologicznego tymi metodami jest stabilność aglutynogenów i możliwość typowania szczepów dających się typować fagami. Wadą tej metody jest brak standardów typowania kontrolowanych przez jeden ośrodek referencyjny.

## TYPOWANIE BAKTERIOFAGOWE

Koncepcja typowania gronkowców za pomocą bakteriofagów została opracowana w latach czterdziestych XX wieku. Fagi wyróżnia określona swoistość (lytic spectrum), a bakterie mają określony wzór fagowy (phage pattern), gdyż lizowane są przez określone fagi. Jest to podstawą do wyróżnienia fagowych grup, a także odpowiadających im grup bakterii typowanych tymi fagami. Do typowania ludzkich szczepów gatunku *S. aureus* stosuje się międzynarodowy zestaw fagów tworzących cztery podstawowe grupy, od I do IV, oraz dodatkową grupę mieszaną [20].

System typowania fagami został wystandaryzowany przez International Subcommittee on Phage Typing of Staphylococci [31]. Od tego czasu stosuje się międzynarodowy zestaw 23 bakteriofagów. Częstokroć dodatkowo używa się dwóch miejscowo wyselekcjonowanych fagów, które stają się bardzo pomocne w typowaniu szczepów nie reagujących na międzynarodowy zestaw fagowy. Liza komórek bakteryjnych powodowana przez bakteriofagi pro-

wadzi do powstawania tzw. lysinek. Rozróżnia się dwa typy reakcji typowania bakteriofagami, reakcję silną i słabą. Reakcja silna zachodzi wtedy, gdy liczba powstałych lysinek na szalce przekracza pięćdziesiąt. Podczas typowania uzyskuje się niekiedy wynik reakcji słabej, jednak do określania pokrewieństwa badanych szczepów wykorzystuje się jedynie wynik uzyskany w reakcji silnej. Tylko taki jest wynikiem brany pod uwagę i statystycznie istotnym. Jeśli u gronkowców nie obserwuje się lizy komórek w trakcie zastosowania standardowego rozcieńczenia (RTD – routine test dilution) wówczas stosuje się stukrotnie wyższe stężenie fagów (100 × RTD).

Przez wiele lat metoda typowania bakteriofagami była powszechnie stosowaną metodą typowania szczepów gatunku *S. aureus*, a także kontrolowania rozprzestrzeniania się szczepów MRSA. Dzięki tej metodzie zidentyfikowano wiele epidemii. Metoda ta ma zdecydowanie większą siłę dyskryminującą niż inne metody fenotypowe, takie jak zymotypowanie czy określanie typu otoczkowego [10,21,33,36].

Wartość tej metody w odniesieniu do szczepów MRSA obniża wysoki odsetek szczepów niemieszczących się w podstawowym zestawie fagów. Niektóre źródła donoszą, że prawie 20-30% szczepów MRSA nie poddaje się typowaniu bakteriofagami [1,39], ale wyniki uzyskane przez Khalifa i wsp. wskazują, że populacja szczepów MRSA niedających się typować fagami może stanowić nawet 75% wszystkich wyizolowanych szczepów [22]. W związku z tak wysokim odsetkiem szczepów nietypowanych wartość uzyskiwanych informacji o pokrewieństwie szczepów jest znacząco zaniżona ze względu na niemożność określenia stopnia pokrewieństwa szczepów nietypowanych. Wartość tej metody jest także znacznie ograniczona z powodu braku powtarzalności uzyskiwanych wyników. Te same szczepy mogą dawać różne wyniki kiedy są typowane na przestrzeni czasu. Problem ten narasta wówczas, gdy przeprowadza się długoterminowe badania nad kolekcją szczepów. Ograniczona powtarzalność testu, bardzo duży nakład pracy powiązany z utrzymaniem fagów i jakości kontroli oraz występowanie szczepów niedających się typować fagami, obniżyły znaczenie tej metody w ciągu ostatniego dziesięciolecia. Pewne nadzieje można wiązać z ewentualnym przyszłym nowym zestawem fagów [33].

## ANTYBIOGRAM – OCENA PROFILU LEKOWRAŻLIWOŚCI

Typowanie na podstawie profilu lekowrażliwości/lekooporności stanowi oprócz fagotypowania podstawową metodę różnicowania szczepów *S. aureus* wśród kilku metod fenotypowych [3]. Metoda ta zyskała szerokie uznanie w placówkach diagnostycznych dzięki swojej względnej łatwości wykonania, a co ważniejsze jako jedna z nielicznych metod jest metodą wystandaryzowaną. Polskie laboratoria, podobnie jak wiele innych w świecie, posługują się standardami NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards – Approved Standards, Fifth Edition NCCLS document M7-A5, 2000), co umożliwia porównywanie wyników między różnymi ośrodkami diagnostycznymi.

Na podstawie obecności lub braku cech oporności, szczepy mogą być różnicowane lub grupowane do tego samego klonu [4]. Wzór oporności bakterii na antybiotyki w pew-

nej mierze zależy od środowiska w jakim znajdują się dane szczepy. W związku z tym identyczne antybiogramy mogą charakteryzować szczepy niespokrewnione jako wynik podobnej selektywnej presji parametrów otoczenia. Może zachodzić również sytuacja odwrotna, w której izolaty tego samego klonu mogą przejawiać różne wzory lekowrażliwości w związku z nabyciem lub utratą plazmidów noszących geny oporności [4,15,42]. W większości przypadków, antybiogram nie może być użyty jako podstawowa metoda typowania szczepów MRSA. Jednak czasami wzór wrażliwości endemicznego lub epidemicznego klonu może być tak różniący się w obrębie badanej populacji, że antybiogram będzie wystarczającą metodą do wyselekcjonowania takiego szczepu.

W badaniach rutynowych znajduje zastosowanie dyfuzyjno-krażkowa metoda oznaczania wrażliwości szczepów na antybiotyki, zwana od nazwisk jej autorów metodą Kirby-Bauera [2]. W laboratoriach diagnostycznych, oprócz metody dyfuzyjno-krażkowej, stosowane są także metody rozcieńczeniowe, np. E-test.

#### **ELEKTROFOREZA BIAŁEK: ANALIZA PROFILU BIAŁEK KOMÓRKOWYCH**

Rzeczony technik elektroforetycznych pozwala porównywać szczepy w oparciu o różnice białek komórkowych powierzeniowych i wydzielniczych lub wszystkich białek poprzednim zlizowaniu komórek. Analiza wszystkich białek komórkowych otrzymanych po degradacji komórek poddanych działaniu lizostafiny może być wykonana techniką elektroforezy w żelu poliakrylamidowym (polyacryl gel electrophoresis – PAGE). Wynikiem takiego rozdzielania elektroforetycznego jest powtarzalny charakterystyczny wzór złożony z około pięćdziesięciu prążków [9,14,43]. Uzyskiwane tą metodą różnice pomiędzy niespokrewnionymi szczepami MRSA są nieznaczne, co z kolei powoduje, iż siła różnicująca takiej metody jest niewielka. Mała niekiedy powtarzalność takich rozdzielania elektroforetycznych a tym samym niemożność porównania próbek szczepów z różnych żeli otrzymanych po analizie elektroforetycznej oraz niewielkie powiązanie wyników z innymi metodami, np. typowaniem za pomocą bakteriofagów, stawia tę metodę w rzędzie technik o niewielkiej przydatności do typowania szczepów *S. aureus*, a zupełnie małej do typowania MRSA na szerszą skalę [46].

#### **ELEKTROFOREZA BIAŁEK: IMMUNOBLOTTING**

Jednym ze sposobów udoskonalenia analizy białek, w celu podniesienia jej wiarygodności, jest wykonanie reakcji Western-blot z użyciem znakowanych przeciwciał antygronkowcowych z rozdzielonymi w trakcie elektroforezy antygenami tego szczepu. Źródłem takich przeciwciał może być zarówno surowica królicza po wcześniejszej ekspozycji zwierzęcia na *S. aureus* jak i mieszana surowica ludzka, przy założeniu, że wystarczająca liczba dawców miała kontakt z patogenem. Immunoblotting jest, w mniejszym stopniu niż poprzednio omówiona analiza białek komórkowych, podatny na zmiany warunków fizykochemicznych podczas elektroforezy. Metodą tą uzyskuje się mniej prążków niż metodą elektroforezy białek, przez co interpretacja wyników staje się łatwiejsza i jednoznaczna. Wszystkie szczepy *S. aureus* są typowalne tą metodą, chociaż podczas epidemii metoda może nie dawać wystarczającego

zróżnicowania, aby prawidłowo wykluczyć niespokrewnione izolaty [8,14,28].

#### **ELEKTROFOREZA BIAŁEK: MLEE**

Metoda MLEE (multilocus enzyme electrophoresis) pozwala na wykrycie zróżnicowania allelicznego wśród patogenów zarówno ludzkich, jak i zwierzęcych, w tym także wśród szczepów gronkowca złocistego. Typowanie metodą MLEE oparte jest na polimorfizmie badanych enzymów komórkowych. Stopień migracji poszczególnych białek zależy bezpośrednio od ich składu aminokwasowego, w związku z czym ponad 80% jednostkowych zmian w składzie aminokwasowym wykrywa się w oparciu o różnice własności elektroforetycznych badanych białek. Zmienność enzymatyczna jest odzwierciedleniem różnic genetycznych powstałych w *loci* tych enzymów. Szczepy bakteryjne mogą zostać zaklasyfikowane do poszczególnych typów elektroforetycznych (electrophoretic types – ET) na podstawie otrzymanych wzorów elektroforetycznych. Natomiast stopień pokrewieństwa izolatów jest określany na podstawie podobieństw i różnic występujących w profilu elektroforetycznym tych izolatów.

W przypadku diagnostyki szczepów MRSA wszystkie izolaty są typowalne, a powtarzalność metody jest zadawalająca. Siła różnicująca tej metody zależy jednak w pewnej mierze od tego, które enzymy zostały wybrane do analizy, gdyż niektóre z nich mogą się okazać monomorficzne nawet w obrębie znacznej kolekcji przebadanych szczepów.

Całkowita liczba analizowanych enzymów waha się w granicach od dwunastu do dwudziestu, ale względna siła różnicująca każdego z nich nie została dotąd oceniona [29,30,43]. Tak więc nie jest możliwe stwierdzenie, jaka jest optymalna kombinacja enzymów pozwalająca na prawidłowe zróżnicowanie szczepów.

#### **ELEKTROFOREZA BIAŁEK: ZYMOTYPOWANIE**

Zymotypowanie jest jedną z odmian metody elektroforezy typu MLEE. Opiera się na polimorfizmie enzymów gronkowcowych należących do grupy lipaz, esteraz. Branger i wsp. zidentyfikowali trzy typy esteraz A, B i C [5]. Polimorfizm enzymów jest określany na podstawie różnic w ruchliwości elektroforetycznej w żelu poliakrylamidowo-agarozowym spowodowanych różnym zakresem aktywności wobec pięciu syntetycznych substratów:  $\alpha$ - i  $\beta$ -octanu naftyli, octanu indoksyli oraz  $\alpha$ - i  $\beta$ -maślanu naftyli, a także oporności na dwuizopropylodifluorofosforan [5]. Podobnie jak w metodzie MLEE szczepy są typowane na podstawie obserwowanych różnic w ruchliwości elektroforetycznej esteraz wyizolowanych z badanych szczepów *S. aureus*. Większość doniesień na temat przeprowadzonych badań z użyciem tej metody pochodzi od jednego zespołu badawczego, który stosował tę metodę do typowania kolekcji szczepów *S. aureus* zarówno wrażliwych jak i opornych na metycylinę. Wyodrębniono wówczas dwadzieścia sześć zymotypów, z których czternaście należało do szczepów MRSA. Jak dotąd wszystkie szczepy są typowalne, a otrzymywany wzór jest powtarzalny i niezmienny. Trudno jest jednak jednoznacznie stwierdzić czy podobieństwa wśród esteraz są odzwierciedleniem pokrewieństw genetycznych między tymi szczepami [5,6,39].

Tabela 1. Metody różnicowania izolatów gatunku *Staphylococcus aureus* w oparciu o cechy fenotypowe

Rodzaj metody	Analizowana grupa cech
Biotypowanie	reakcja wytwarzania stafylokinazy, $\beta$ -hemolizyny, koagulacja osocza bydlęcego, typ wzrostu na agarze z fioletem krystalicznym
Serotypowanie • metoda Qedinga i Haukenesa • metoda Pilleta	określenie typu serologicznego otoczki oraz typu koagulazy
Typowanie bakteriofagowe (zestawy fagów I – IV, grupa mieszana)	określenie wzrostu fagowego (liza przez określone fagi)
Elektroforeza białek • MLEE (multilocus enzyme electrophoresis) • zymotypowanie • analiza profilu białek komórkowych – proteomu  • Immunoblotting	polimorfizm badanych enzymów komórkowych (12–20 enzymów) polimorfizm enzymów gronkowcowych należących do lipaz i esteraz analiza różnic białek komórkowych i wydzielniczych lub wszystkich białek po zlizowaniu komórki reakcja Western-blot z użyciem znakowanych przeciwciał antygronkowcowych z rozdzielonymi w trakcie elektroforezy antygenami badanego szczepu
Ocena profilu lekowrażliwości (antybiogram)	wzór oporności na antybiotyki, wykrycie mechanizmów oporności

#### IDENTYFIKACJA GATUNKOWA *S. AUREUS* W LABORATORIUM DIAGNOSTYCZNYM

Materiały kliniczne diagnozowane pod kątem obecności *S. aureus* można posiewać na podłoże agarowe z 5% krwią baranią lub podłoże wybiórcze, np. podłoże Chapmana albo Baird Parkera. Charakterystyczne kolonie gronkowców izolowane z odpowiednich podłoży poddaje się dalszej szczegółowej analizie. W rutynowej diagnostyce laboratoryjnej, w identyfikacji gronkowców do gatunku, stosuje się metody biochemiczne, pozwalające na wykrycie:

- białka CF (clumping factor) – test szkiełkowy z plazmą króliczą;
- koagulazy wolnej – test próbówkowy z rozcieńczoną plazmą króliczą;
- DNA-zy termostabilnej;
- wykrycie jednoczesne CF, białka A, a niekiedy antygenów otoczki polisacharydowej, z zastosowaniem latek-sowych testów komercyjnych;
- cech biochemicznych z zastosowaniem komercyjnych testów diagnostycznych.

Szczepy bakteryjne zidentyfikowane w ten sposób w rutynowej diagnostyce mikrobiologicznej mogą być poddane dalszym metodom analizy genetycznej stosowanym w dochodzeniach epidemiologicznych [18,41].

#### PODSUMOWANIE

Konwencjonalna identyfikacja gatunków gronkowców oparta jest na charakterystyce morfologicznej, właściwościach fizjologicznych oraz chemicznym składzie ściany komórkowej [1,7,19,23,35]. Dokładność konwencjonalnych testów jest niewielka i mieści się w przedziale 50–70% [16,19,32]. Ze względu na to, że fenotyp charakteryzujący dany szczep

powstaje dzięki współdziałaniu genotypu bakterii oraz czynników środowiskowych, dochodzić może do sytuacji, kiedy szczepy niespokrewnione, pod wpływem działania selekcyjnej presji środowiska zewnętrznego, będą charakteryzowały się identycznymi profilami, co z kolei prowadzi do błędnego określenia korelacji epidemiologicznych zachodzących między tymi szczepami. Zatem opracowanie metod szybkiej i dokładnej identyfikacji gronkowców stało się niezmiernie ważne, gdyż umożliwia wczesne wykrywanie ich potencjalnej zdolności do powodowania określonego stanu chorobowego, ustalenie wrażliwości na antybiotyki oraz może być pomocne w wyjaśnieniu klinicznego znaczenia każdego gatunku.

Obecnie główną rolę w typowaniu bakterii, a w tym także gatunku *S. aureus* przejęły metody molekularne oparte na analizie genomu bakteryjnego [24,26,38], zwłaszcza w przypadkach zakażeń powodowanych przez atypowe szczepy niemające typowych cech biochemicznych [13,27,44]. Natomiast diagnostyczne metody fenotypowe odgrywają istotną rolę w określeniu rodzaju i gatunku analizowanych szczepów oraz pełnią funkcję metod pomocniczych w typowaniu epidemiologicznym [34,40]. Zestawienie różnych metod fenotypowych stosowanych dawniej i obecnie w różnicowaniu bakterii gatunku *S. aureus* przedstawia tabela 1.

Największe wyzwanie stanowi przeprowadzenie analizy, która miarodajnie i wiarygodnie będzie grupować szczepy epidemiologicznie spokrewnione oraz pozwoli wyróżniać je od szczepów niespokrewnionych. Zwyczajowo systemy typowania stosuje się do analizy epidemii szpitalnych, ale są one także pomocne w leczeniu pacjentów pozwalając określić, czy dana infekcja jest infekcją pierwotną czy też nawracającą. Metody typowania przede wszystkim jednak umożliwiają poznanie i zrozumienie epidemiologii zakażeń.

#### PIŚMIENNICTWO

[1] Bannerman T.L., Hancock G.A., Tenover F.C., Miller J.M.: Pulsed field gel electrophoresis as a replacement for bacteriophage typing *Staphylococcus aureus*. J. Clin. Microbiol., 1995; 33: 551–555

[2] Bauer A.W., Kirby W.M., Sherris J.C., Turck M.: Antibiotic susceptibility testing by a standardized disk method. Am. J. Clin. Pathol., 1966; 45: 493–496

- [3] Blanc D.S., Lugeon C., Wenger A., Siegrist H.H., Francioli P.: Quantitative antibiogram typing using inhibition zone diameters compared with ribotyping for epidemiological typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.*, 1994; 32: 2505–2509
- [4] Blanc D.S., Petignat C., Moreillon P., Wenger A., Bille J., Francioli P.: Quantitative antibiogram as a typing method for the prospective epidemiological surveillance and control of MRSA: Comparison with molecular typing. *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.*, 1996; 17: 654–659
- [5] Branger C., Goulet P.: Esterase electrophoretic polymorphism of methicillin-sensitive and methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus*. *J. Med. Microbiol.*, 1987; 24: 275–281
- [6] Branger C., Goulet P.: Genetic heterogeneity in methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus* revealed by esterase electrophoretic polymorphism. *J. Hosp. Infect.*, 1989; 14: 125–134
- [7] Brun Y., Bes M., Boefufgras J.M., Monget D., Fleurette J., Auckenthaler R., Devriese L.A., Kocur M., Marples R.R., Piemont Y.: International collaborative evaluation of the ATB 32<sup>st</sup> staph gallery for identification of the *Staphylococcus species*. *Zentralbl. Bakteriol.*, 1990; 273: 319–326
- [8] Burnie J.P., Matthews R.C., Lee W., Murdoch D.: A comparison of immunoblot and DNA restriction patterns in characterising methicillin-resistant isolates of *Staphylococcus aureus*. *J. Med. Microbiol.*, 1989; 29: 255–261
- [9] Costas M., Cookson B.D., Talsania H., Owen R.: Numerical analysis of electrophoretic protei patterns of methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.*, 1989; 27: 2574–2581
- [10] Cox R.A., Conquest C., Mallaghan C., Marples R.R.: A major outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* caused by a new phage-type (EMRSA-16). *J. Hosp. Infect.*, 1995; 29: 87–106
- [11] Devriese L.A.: A simplified system for biotyping *Staphylococcus aureus* strains isolated from animal species. *J. Appl. Bacteriol.*, 1984; 56: 215–220
- [12] Dzierżanowska D.: Antybiotykoterapia praktyczna.  $\alpha$ -medica press, Bielsko-Biała, 2000
- [13] Garbacz K., Galiński J.: Atypowe szczepy gronkowca złocistego (*Staphylococcus aureus*) nie posiadające koagulazy lub czynnika zlepnego (CF). *Post. Mikrobiol.*, 2006; 45: 39–43
- [14] Gaston M.A., Duff P.S., Naidoo J., Ellis K., Roberts J.I., Richardson J.F., Marples R.R., Cooke E.M.: Evaluation of electrophoretic methods for typing methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Med. Microbiol.*, 1988; 26: 189–197
- [15] Gillespie M.T., Lyon B.R., Skurray R.A.: Typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by antibiotic resistance phenotypes. *J. Med. Microbiol.*, 1990; 31: 57–64
- [16] Grant C.E., Sewell D.L., Pfaller M., Bumgardner R.V., Williams J.A.: Evaluation of two commercial systems for identification of coagulase-negative staphylococci to species level. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 1994; 18: 1–5
- [17] Hacek D.M., Suriano T., Noskin G.A., Kruszynski J., Reisberg B., Peterson L.R.: Medical and economic benefit of a comprehensive infection control program that includes routine determination of microbial clonality. *Am. J. Clin. Pathol.*, 1990; 111: 647–654
- [18] Hryniewicz W.: Epidemiology of MRSA. *Infection*, 1999; 27: S13–S16
- [19] Ieven M., Verhoeven J., Pattyn S.R., Goossens H.: Rapid and economical method for species identification of clinically significant coagulase-negative staphylococci. *J. Clin. Microbiol.*, 1995; 33: 1060–1063
- [20] Jeljaszewicz J., Cybulska J., Dziarski R., Hryniewicz W., Ludwicka A., Świtalski L.M.: Ziarenkowce gram-dodatnie: biologia, rozpoznanie i różnicowanie. Państwowy Zakład Higieny, Warszawa 1978
- [21] 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
- [22] Khalifa K.I., Heiba A.A., Hancock G.: Nontypeable bacteriophage patterns of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* involved in a hospital outbreak. *J. Clin. Microbiol.*, 1989; 27: 2249–2251
- [23] Kloos W.E., Schleifer K.H., Gotz F.: The genus *Staphylococci*. W: *The Prokaryotes*, red. A. Balows, H. G. Truper, M. Dworkin, W. Harder, K. H. Schleifer. Springer-Verlag, New York 1991, 1369–1420
- [24] Krawczyk B., Samet A., Leibner J., Śledzińska A., Kur J.: Evaluation of a PCR melting profile technique for bacterial strain differentiation. *J. Clin. Microbiol.*, 2006; 44: 2327–2332
- [25] Łopaciuk U., Dzierżanowska D.: Gronkowce metycylinooporne: mechanizmy oporności, czynniki zjadliwości oraz metody genotypowania. *Post. Mikrobiol.*, 2002; 41: 401–418
- [26] Małachowa N., Sabat A., Gniadkowski M., Krzysztofi-Russjan J., Empel J., Międzobrodzki J., Kosowska-Shick K., Appelbaum P.C., Hryniewicz W.: Comparison of multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis with pulsed-field gel electrophoresis, spa typing and multilocus sequence typing for clonal characterization of *Staphylococcus aureus* isolates. *J. Clin. Microbiol.*, 2005; 43: 3095–3100
- [27] Młynarczyk A., Młynarczyk G., Szymanowska A., Stańczak J., Łuczak M., Jeljaszewicz J.: Zastosowanie PCR do oceny występowania genów *coa i nuc* u metycylinoopornych, koagulazoujemnych szczepów *Staphylococcus aureus* (MRSA-CN). *Med. Dośw. Mikrobiol.*, 2000; 52: 217–222
- [28] Mulligan M.E., Kwok R.Y., Citron D.M., John J.F., Smith P.B.: Immunoblots, antimicrobial resistance and bacteriophage typing of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.*, 1988; 26: 2395–2401
- [29] Musser J.M., Kapur V.: Clonal analysis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from intercontinental sources: association of the *mec* gene with divergent phylogenetic lineages implies dissemination by horizontal transfer and recombination. *J. Clin. Microbiol.*, 1992; 30: 2058–2063
- [30] Opal S.M., Mayer K.H., Stenberg M.J., Blazek J.E., Mikolich D.J., Dickensheets D.L., Lythe L.W., Trudel R.R., Musser J.M.: Frequent acquisition of multiple strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by healthcare workers in an endemic hospital environment. *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.*, 1990; 11: 479–485
- [31] Parker M.T.: Phage-typing of *Staphylococcus aureus*. W: *Methods in Microbiology*, red. J.R. Norris, D.W. Ribbons. Academic Press, London 1972, 1–28
- [32] Perl T.M., Rhomberg P.R., Bale M.J., Fuchs P.C., Jones R.N., Koontz F.P., Pfaller M.A.: Comparison of identification systems for *Staphylococcus epidermidis* and other coagulase-negative *Staphylococcus species*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 1994; 18: 151–155
- [33] Piechowicz L., Galiński J., Dajnowska-Stanczewska A., Garbacz K.: Fagotypy *Staphylococcus aureus* izolowane w Polsce w latach 1999–2004. *Med. Dośw. Mikrobiol.*, 2005; 57: 105–113
- [34] Przondo-Mordarska A.: Podstawowe procedury laboratoryjne w bakteriologii klinicznej. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2005
- [35] Renneberg J., Rieneck K., Gutschik E.: Evaluation of Staph ID 32<sup>st</sup>-system and Staph-Zym system for identification of coagulase-negative staphylococci. *J. Clin. Microbiol.*, 1995; 33: 1150–1153
- [36] Richardson J.F., Reith S.: Characterization of a strain of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (EMRSA-15) by conventional and molecular methods. *J. Hosp. Infect.*, 1993; 25: 45–52
- [37] Rubin R. J., Harrington C. A., Poon A., Dietrich K., Greene J. A., Moiduddin A.: The economic impact of *Staphylococcus aureus* infection in New York City Hospitals. *Emerg. Infect. Dis.*, 1999; 5: 9–17
- [38] Sabat A., Melles D.C., Mertirosian G., Grundmann H., van Belkum A., Hryniewicz W.: Distribution of the serine-aspartate repeat protein-encoding *sdr* genes among nasal-carriage and invasive *Staphylococcus aureus* strains. *J. Clin. Microbiol.*, 2006; 44: 1135–1138
- [39] Schlichting C., Branger C., Fournier J.M., Witte W., Boutonnier A., Wolz C., Goulet P., Doring G.: Typing of *Staphylococcus aureus* by pulsed field gel electrophoresis, zymotyping, capsular typing and phage typing: resolution of clonal relationships. *J. Clin. Microbiol.*, 1993; 31: 227–232
- [40] Schwarzkopf A., Schmidt-Rotte H., Schmidt H., Kunz E., Karch H., Heesemann J.: Molecular analysis of nosocomial infection by oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* lacking protein A and clumping factor. *Lancet*, 1992; 340: 621
- [41] Szewczyk E.M.: Diagnostyka bakteriologiczna. PWN, Warszawa 2005
- [42] Tenover F.C., Arbeit R., Archer G., Biddle J., Byrne S., Goering R., Hancock G., Hebert G.A., Hill B., Hollis R.: Comparison of traditional and molecular methods of typing isolates of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.*, 1994; 32: 407–415
- [43] Thomson-Carter F.M., Pennington T.H.: Characterisation of methicillin-resistant isolates of *Staphylococcus aureus* by analysis of whole-cell and exported proteins. *J. Med. Microbiol.*, 1989; 28: 25–32
- [44] Vandenesch F., Bes M., Lebeau C., Greenland T., Brun Y., Etienne J.: Coagulase-negative *Staphylococcus aureus*. *Lancet*, 1993; 342: 995–996
- [45] Watts A., Ke D., Wang Q., Pillay A., Nicholson-Weller A., Lee J.C.: *Staphylococcus aureus* strains that express serotype 5 or serotype 8 capsular polysaccharides differ in virulence. *Infect. Immun.*, 2005; 73: 3502–3511
- [46] Weller T.M.: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* typing methods: which should be the international standard? *J. Hosp. Infect.*, 2000; 44: 160–172