

WYKRYWANIE ENTEROTOKSYNOGENNYCH SZCZEPÓW *STAPHYLOCOCCUS* SPP., WYIZOLOWANYCH OD KRÓW Z *MASTITIS*, METODĄ MULTIPLEKS PCR

Paweł Nawrotek, Marta Świdarska, Karol Fijałkowski,
Katarzyna Kogut, Danuta Czernomysy-Furowicz

Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie

Streszczenie. Celem podjętych badań była identyfikacja oraz analiza molekularna 35 szczepów *Staphylococcus* spp., wyizolowanych z mleka krów z kliniczną postacią *mastitis*, pod kątem ich potencjalnej zdolności do wytwarzania enterotoksyn gronkowcowych (SEs), najczęściej wywołujących zatrucia pokarmowe ludzi (SEA-SEE). Wytypowane szczepy scharakteryzowano wstępnie na podstawie wzrostu kolonii bakteryjnych na chromogennym podłożu CHROMagar Staph. aureus. Następnie wszystkie izolaty analizowano z użyciem gatunkowo specyficznej reakcji PCR, ukierunkowanej na wykrycie dwóch markerów molekularnych: *nuc* – specyficznego dla gatunku *S. aureus* i *gehM* – specyficznego dla *S. xylosus*. Dodatkowo oznaczano enterotoksynogenność wykrytych szczepów (obecność genów *sea-see*, w tym *secv*), z użyciem metody multipleks PCR. Spośród 35 analizowanych izolatów aż 18 szczepów (51,4%) stanowiło gronkowce koagulazoujemne (CNS) z gatunku *S. xylosus*, a tylko dwa izolaty (5,7%) należały do koagulazododatnich szczepów *S. aureus*. W przypadku siedmiu szczepów *S. xylosus* (20%) wykryto metodą multipleks PCR geny enterotoksyn (*se*) zidentyfikowane jako: *sea* (71,4%), *secv* (14,3%) oraz *sed* (14,3%). Ponadto, w DNA pięciu spośród tych szczepów (71,4%), uzyskano amplikony specyficzne dla innych, bliżej nieokreślonych genów *se* lub ich wariantów, które na podstawie analizy *in silico* oznaczono jako: *seg*, *seh*, *sei* lub *selu*. Uzyskane wyniki wskazują na konieczność uwzględniania w diagnostyce gronkowców koagulazoujemnych ich właściwości toksynogennych, ponieważ mogą one stanowić ważną grupę mikroorganizmów obecnych w żywności. Przyczyniły się także do podkreślenia znaczącej roli enterotoksynogennych szczepów *S. xylosus* w etiologii *mastitis*. Wykonane badania potwierdziły przydatność metod molekularnych do wykrywania potencjalnie enterotoksycznych szczepów *Staphylococcus* spp. izolowanych od zwierząt.

Słowa kluczowe: geny enterotoksyn, gronkowce koagulazoujemne, *mastitis*, multipleks PCR, *S. xylosus*, *Staphylococcus* spp.

WSTĘP

Bakterie z rodzaju *Staphylococcus* (gronkowce) są szeroko rozpowszechnioną, patogenną grupą mikroorganizmów, dysponujących dużym wachlarzem czynników wirulencji.

Adres do korespondencji – Corresponding author: dr inż. Paweł Nawrotek, Katedra Immunologii, Mikrobiologii i Chemii Fizjologicznej, Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie, ul. Doktora Judyma 24, 71-466 Szczecin, e-mail: pawel.nawrotek@zut.edu.pl

cji umożliwiających kolonizację i inwazję organizmu gospodarza. Istotnym elementem ich chorobotwórczości jest zdolność omijania mechanizmów obronnych, a także ekspresja zewnątrzwydzielniczych białek, w tym enterotoksyn gronkowcowych – SEs (ang. staphylococcal enterotoxins), charakteryzujących się wyjątkowymi właściwościami biologicznymi i fizykochemicznymi. Ze względu na wszechobecność gronkowców w środowisku ludzi i zwierząt, istnieje duże ryzyko wywołania stanu chorobowego oraz kontaminacji produktów spożywczych. Szczepy z gatunku *S. aureus* (gronkowiec złocisty), które wytwarzają enterotoksyny, wywołują groźne zatrucia pokarmowe człowieka. Jednocześnie stanowią ważny czynnik etiologiczny wielu chorób zwierząt, w tym zapalenia gruczołu mlekowego (*mastitis*) krów, co potencjalnie wiąże to schorzenie z zatruciem enterotoksyną gronkowcową (intoksykacją) człowieka. Chorobotwórcze mikroorganizmy zanieczyszczające żywność stanowią istotny problem zdrowotny. Mleko pochodzące od krów z *mastitis* oraz produkty z niego otrzymywane mogą być przyczyną zakażeń bakteryjnych oraz zatruc toksynami bakteryjnymi [Tietze i in. 2004, Kuźma i in. 2005, Malinowski i Gajewski 2009]. Asao i in. [2003] potwierdzili bezpośredni związek między spożyciem mleka i produktów mlecznych a intoksykacją.

Obecność genów determinujących wytwarzanie enterotoksyn stwierdzana jest nie tylko w przypadku szczepów *S. aureus*. Często wykrywa się je także u innych gronkowców, w tym koagulazoujemnych – CNS (ang. coagulase-negative staphylococci). Wyniki licznych badań wskazują na obecność genów enterotoksyn (*se*) w genomach, m.in. takich gatunków gronkowców, jak: *S. xylosum*, *S. chromogenes*, *S. saprophyticus*, *S. lentus*, *S. warneri*, *S. sciuri*, *S. haemolyticus*, a także genu toksyny zespołu wstrząsu toksycznego (*tst*) u: *S. xylosum*, *S. saprophyticus*, *S. warneri*, *S. hominis*, *S. haemolyticus*, co w tym kontekście skłania do ponownego przyjrzenia się tym bakteriom [Wilson i in. 1991, Udo i in. 1999, Nedelkov i Nelson 2003].

Dzięki zdolności do ekspresji różnego rodzaju czynników zjadliwości (wirulencji) gronkowce, zwłaszcza *S. aureus*, są zdolne do wywołania wielu jednostek chorobowych [Sibbald i in. 2006, Koziol i in. 2008]. Enterotoksyny, nazywane też superantygenami – SAGs (ang. superantigens), odgrywają ważną rolę w patogenezie chorób gronkowcowych, ponieważ należą do dużej, heterogennej rodziny pirogennych egzotoksyn – PTSAgs (ang. pyrogenic toxin superantigens) [Orwin i in. 2001, Nawrotek i in. 2005]. Obecnie wyróżnia się już 28 typów serologicznych, oznaczonych literami od A do V. Dodatkowo cyframi arabskimi oznaczono siedem wariantów enterotoksyn: A, B, C, G, I, N oraz U [Letertre i in. 2003, Seo i in. 2010]. Siedem enterotoksyn zaliczono do „klasycznych”, są to: SEA, SEB, SEC₁, SEC₂, SEC₃, SED i SEE. Natomiast do „nowych” typów zaliczono: SEG, SEH, SEI, SEIJ, SEIK, SEIL, SEIM, SEIO, SEIP, SEIQ, SER, SES, SET, SEIU, SEIV oraz warianty: SEAv, SEBv, SEG₂, SEIv, SEINv i SEIUv [Letertre i in. 2003, Nawrotek i in. 2005, Thomas i in. 2006, Ono i in. 2008, Seo i in. 2010].

Większość genów *se*, odpowiedzialnych za syntezę enterotoksyn gronkowcowych, zlokalizowana jest w genomowym DNA, ale występują także na ruchomych elementach materiału genetycznego bakterii, do których należą: fagi, transpozony, plazmidy i wyspy patogenności, uczestniczące w horyzontalnym transferze genów – HGT (ang. horizontal gene transfer) [Loir i in. 2003, Omoe i in. 2003, Nawrotek i in. 2005, Bhatia i Zahoor 2007,

Brody i in. 2008]. Transfer mobilnych elementów genetycznych – MGEs (ang. mobile genetic elements), na których znajdują się geny odpowiedzialne za oporność na antybiotyki oraz wirulencję gronkowców, umożliwia bakteriom nabywanie nowych zdolności [Brody i in. 2008].

Dynamiczny rozwój metod molekularnych umożliwił szybką i coraz bardziej dokładną detekcję genów *se* kodujących enterotoksyny gronkowcowe. Jednocześnie ze względu na dużą zmienność sekwencji kodujących SEs i związaną z tym coraz większą ilością typów serologicznych ich wiarygodna identyfikacja staje się znacznie utrudniona. Uznając klasyczne i nowe typy SEs za ważny element chorobotwórczości bakterii z tego rodzaju, potencjalnie wiążący *mastitis* z intoksykacją człowieka, jako cel podjętych badań przyjęto identyfikację oraz analizę molekularną 35 szczepów *Staphylococcus* spp., wyizolowanych z mleka krów z kliniczną postacią *mastitis*, pod kątem ich potencjalnej zdolności do wytwarzania enterotoksyn gronkowcowych najczęściej wywołujących zatrucia pokarmowe ludzi (SEA-SEE).

MATERIAŁ I METODY

Materiał badawczy stanowiło 35 szczepów *Staphylococcus* spp., wyizolowanych z mleka 35 krów rasy polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej z kliniczną postacią *mastitis*, podczas badań przeprowadzonych w 2007 r. w jednym z gospodarstw wielkostadnych, zlokalizowanych na terenie Pomorza Zachodniego. Wszystkie wyosobnione szczepy stanowiły kolekcję Katedry Immunologii, Mikrobiologii i Chemii Fizjologicznej ZUT w Szczecinie, a ich przynależność rodzajową ustalono wcześniej w oparciu na analizie właściwości morfologicznych i biochemicznych oraz identyfikację specyficznego markera genetycznego – *rpoB*, kodującego podjednostkę B polimerazy RNA. Oprócz badanych izolatów, wykorzystano również wzorcowy szczep *S. aureus* IMDMC 114 (*sed*) z kolekcji własnej, wyizolowany od krowy z ostrym zapaleniem gruczołu mlekowego, stanowiący pozytywną kontrolę zastosowanej procedury PCR. Enterotoksyczność tego szczepu potwierdzono w teście odwróconej biernej aglutynacji lateksowej (RPLA), z użyciem zestawu SET-RPLA (Oxoid). Do czasu dalszych analiz badane szczepy były przechowywane w stanie zamrożenia w temperaturze -20°C w podłożu Tryptone Soya Broth (TSB, Oxoid) zawierającym 10% glicerolu.

Każdorazowo przed kolejnym etapem badań szczepy rozmrażano w 37°C , a następnie 50 mL tak przygotowanej hodowli wysiewno na podłoże Brain-Heart Infusion Agar (BHI agar, Oxoid) i inkubowano w temperaturze 37°C w ciągu 18 godzin. Z uzyskanej czystej hodowli pobierano jedną kolonię, którą przesiewano na pożywkę diagnostyczną do prowadzenia dalszej oceny pod względem morfologicznym lub też zawieszano w 1 mL TSB i poddawano 18-godzinnej inkubacji, w celu uzyskania hodowli do izolacji bakteryjnego DNA metodą grawitacyjną, z użyciem gotowego zestawu Genomic Mini AX BACTERIA (A&ABiotechnology), zgodnie z zaleceniami producenta. Stężenie wyizolowanego i oczyszczonego genomowego DNA mierzono metodą fluorescencyjną, wykorzystując zestaw Quant-iT dsDNA BR assay kit (Invitrogen, Molecular Probes), według zaleceń producenta.

Wstępną identyfikację gatunkową badanych gronkowców przeprowadzono na podstawie analizy wzrostu kolonii bakteryjnych na chromogennym podłożu diagnostycznym – CHROMagar Staph. aureus (Graso), wykorzystując klucz podany przez Gaillota i in. [2000]. Następnie wszystkie izolaty analizowano z użyciem gatunkowo specyficznego PCR, ukierunkowanej na wykrycie dwóch markerów molekularnych: genu *nuc*, kodującego pozakomórkową termostabilną nukleazę, specyficznego dla gatunku *S. aureus* i *gehM*, kodującego lipazę, swoistego dla *S. xylosus*. Specyficzne dla genu *nuc* startery przygotowano na podstawie sekwencji podanej przez Hilla [1996], natomiast warunki reakcji PCR opracowano na podstawie pracy Wilsona i in. [1991]. Z kolei startery flankujące fragment genu *gehM* wraz z warunkami reakcji PCR, przygotowano w oparciu na danych podanych w opracowaniu Iacumin i in. [2006]. Enterotoksynogenność wykrytych szczepów (obecność genów *sea-see*, w tym *secv*) oznaczano z użyciem metody multipleks PCR, realizowanej w oparciu na danych zawartych w pracy Sharmy i in. [2000], z użyciem starterów (jednego uniwersalnego i sześciu specyficznych dla genów *sea-see*, w tym *secv*) oraz warunków reakcji podanych przez tych autorów.

Wszystkie reakcje amplifikacji prowadzono z użyciem gotowego zestawu AmpliTaq Gold PCR Master Mix (Applied Biosystems), stosując zalecenia producenta. Mieszanie reakcyjną przygotowano w komorze antykontaminacyjnej – DNA/RNA UV-Cleaner, typ UVC/T-AR (Biosan). PCR przeprowadzono dwukrotnie, celem potwierdzenia powtarzalności wyników, w termocyklerze PeqStar 96 Universal Gradient (Peqlab). Uzyskane amplikony analizowano po przeprowadzeniu rozdzielania elektroforetycznego w 10-procentowym żelu poliakrylamidowym (Sigma-Aldrich) w aparacie Protean II xi Cell z zasilaczem PowerPac Basic (Bio-Rad) i wybarwieniu bromkiem etydyny 0,005% (vv) (EtBr, Merck). Wielkość rozdzielonych na żelu produktów PCR porównywano z markerami mas molekularnych DNA: MassRuler Express DNA Ladder, w zakresie 1000–100 pz oraz Φ X174DNA/*Bsu*RI, w zakresie 1353–118 pz (Fermentas). Amplikony archiwizowano, a następnie analizowano przez odczyt densytometryczny prążków i ocenę jakościowo-ilościową w świetle UV, z wykorzystaniem systemu IG/LHR InGenius LHR (Syngene Bio Imaging) oraz oprogramowania GeneSnap i GeneTools (Syngene).

Dodatkowo na podstawie analizy *in silico* 23 wybranych sekwencji nukleotydowych genów *se*, pobranych z bazy danych NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov), przeanalizowano komplementarność zastosowanych w teście multipleks PCR starterów względem sekwencji genów *sea-see* oraz *seav* i *sebv*, kodujących klasyczne enterotoksyny gronkowcowe, jak również ich specyficzność względem pozostałych genów enterotoksyn i ich wariantów (*seg-selu*).

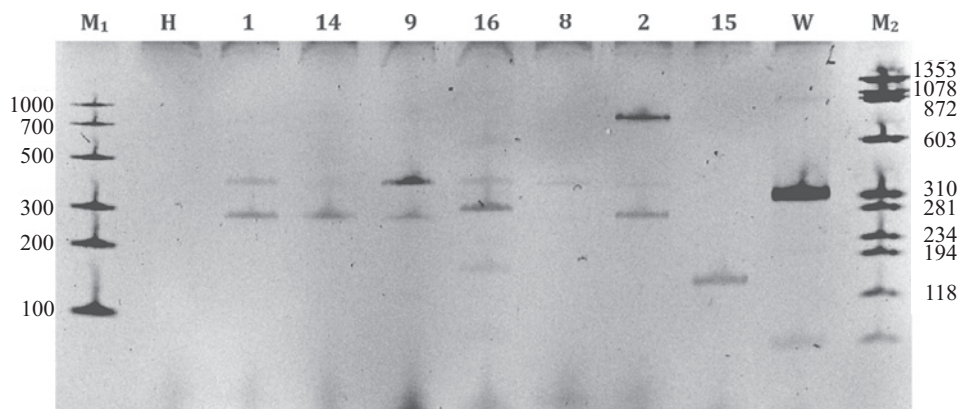
WYNIKI I DISKUSJA

Na podstawie wstępnej identyfikacji gatunkowej badanych gronkowców, przeprowadzonej w oparciu na analizie wzrostu kolonii bakteryjnych na chromogennym podłożu CHROMagar Staph. aureus, a następnie potwierdzonej z użyciem gatunkowo specyficznego PCR ustalono, że spośród wszystkich 35 przeanalizowanych izolatów aż 18 szcze-

pów (51,4%) stanowiło gronkowce koagulazoujemne (CNS) z gatunku *S. xylosus*, podczas gdy tylko dwa izolaty (5,7%) należały do koagulazodatnich szczepów *S. aureus*. Pozostałe szczepy reprezentowały inne gatunki z rodzaju *Staphylococcus*, jednak w ich przypadku nie potwierdzano przynależności gatunkowej z użyciem specyficznej reakcji PCR.

Z kolei w następstwie przeprowadzonej reakcji multipleks PCR, wykonywanej jednocześnie z siedmioma starterami, każdorazowo uzyskiwano powtarzalne profile amplikonów *se* o masie molekularnej od 138 do 743 pz, w przypadku siedmiu wykrytych szczepów *S. xylosus*, co stanowiło 20% wszystkich badanych izolatów (rys. 1). Dokładna analiza otrzymanych danych pozwoliła na zidentyfikowanie, w ich materiale genetycznym, co najmniej siedmiu różnych genów *se* (lub ich wariantów). Porównanie położenia amplikonów, względem markerów mas molekularnych (MassRuler Express DNA Ladder i Φ X174DNA/*Bsu*RI), pozwoliło na identyfikację trzech genów kodujących „klasyczne” SEs: *sea* w genomie pięciu szczepów (71,4%), *secv* w genomie jednego (14,3%) oraz *sed* również w DNA jednego szczepu (14,3%). W tym przypadku masa molekularna (pz) uzyskanych amplikonów była zgodna z oczekiwaną wielkością produktów PCR, charakterystyczną dla poszczególnych genów *se*, podawaną przez Sharma i in. [2000]. Zgodnie z ustaleniami tych autorów, nieco większe wartości masy molekularnej, uzyskane dla produktów amplifikacji: *secv* (138 pz) i *sed* (743 pz), mogą być związane z ewentualnymi estymacjami wielkości amplikonu *secv*, natomiast w przypadku *sed* – obecnością tzw. ekstra produktu, który może występować wyłącznie w przypadku obecności genu *sed* [Sharma i in. 2000]. Zbiorcze zestawienie mas molekularnych amplikonów genów *se*, zidentyfikowanych w przypadku siedmiu enterotoksynogennych szczepów *S. xylosus*, przedstawiono w tab. 1.

W badaniach podjęto także próbę zidentyfikowania dodatkowych produktów PCR, specyficznych dla innych, bliżej nieokreślonych genów *se* lub ich wariantów, uzyskanych w przypadku pięciu wykrytych szczepów *S. xylosus* (71,4%). W tym celu, w oparciu o analizę *in silico* 23 wybranych sekwencji nukleotydowych *se*, sprawdzono specyficzność starterów, wykorzystywanych w teście multipleks PCR, względem zsekwencjonowanych genów *se* oraz ich znanych wariantów. Zaobserwowano, że zaprojektowany przez Sharma i in. [2000] starter uniwersalny był komplementarny w 85–95% do poszukiwanych przez badaczy genów *sea-see*. Podobną zależność wykazano także w przypadku innych genów *se*, m.in.: *seav*, *sebv*, *seg*, *seg₂*, *seh*, *sei*, *selj*, *selp* oraz *selu*, co świadczy o możliwości przyłączenia startera uniwersalnego do matrycy innych (niż zakładane w badaniu) genów enterotoksyn oraz ich wariantów. Ponadto wykazano, iż dwie pary starterów: uniwersalny i specyficzny dla genu *sea* lub (podczas drugiej reakcji) – *secv*, mogą pozwolić na amplifikację również innych genów *se*. W toku badań ustalono, iż wielkość uzyskanych w teście dodatkowych produktów PCR najbardziej zbliżona była do masy molekularnej charakterystycznej wyłącznie dla jednego z czterech genów kodujących „nowe” typy SEs: *seg*, *seh*, *sei* lub *selu*, natomiast stwierdzona niepełna komplementarność zastosowanych starterów do sekwencji analizowanych genów może potwierdzać fakt istnienia ich wariantów (tab. 1).



Rys. 1. Obraz rozdziału elektroforetycznego w 10-procentowym żelu poliakrylamidowym zamplifikowanych genów *se* wykrytych w DNA siedmiu spośród 35 badanych szczepów *Staphylococcus* spp. Objaśnienia: M₁ – marker MassRuler Express DNA Ladder, w zakresie 1000–100 pz, M₂ – marker ΦX174DNA/*Bsu*RI, w zakresie 1353–118 pz, H – H₂O, W – szczep wzorcowy *S. aureus* IMDMC 114 (*sed* – 306 pz), 1, 2, 8, 9, 14, 15 i 16 – numery zidentyfikowanych enterotoksynogennych szczepów *S. xylo*sus, w których DNA wykryto obecność genów: *sea*, *secv* i *sed* oraz jednego z bliżej nieokreślonych genów *se* (*seg*, *seh*, *sei* lub *selu*), albo ich wariantów

Fig. 1. Image of 10% polyacrylamide gel electrophoresis of *se* amplicons from DNA of seven among 35 investigated *Staphylococcus* spp. strains. Explanations: M₁ – MassRuler Express DNA Ladder, 1000–100 bp, M₂ – ΦX174DNA/*Bsu*RI, 1353–118 bp, H – H₂O, W – reference strain of *S. aureus* IMDMC 114 (*sed* – 306 bp), 1, 2, 8, 9, 14, 15 and 16 – numbers of identified enterotoxigenic *S. xylo*sus strains – the strains were positive for the presence of *sea*, *secv* and *sed* genes or one of the unidentified genes of *se* (*seg*, *seh*, *sei* or *selu*), including their variants

Interesujące jest, że wśród wykrytych enterotoksynogennych szczepów, wyizolowanych z mleka krów chorych na *mastitis*, nie było żadnego szczepu *S. aureus*. Co więcej, gronkowiec złocisty stanowił jedynie 5,7% wszystkich analizowanych izolatów. Wyniki badań wielu autorów [Wilson i in. 1991, Udo i in. 1999, Nedelkov i Nelson 2003] wskazują, że geny kodujące enterotoksyny często występują u innych gronkowców, w tym także wśród gronkowców koagulazoujemnych (CNS). Fakt ten ma ogromne znaczenie w profilaktyce zatruc pokarmowych człowieka. Jeszcze do niedawna powszechnie sądzono, że to głównie gronkowiec złocisty jest odpowiedzialny za zjawisko intoksykacji, na co jednoznacznie wskazywały realizowane w przeszłości badania [Garcia i in. 1980]. Z kolei Lamprell i in. [2004] wyizolowali z serów wyrabianych z surowego mleka 1036 szczepów, wśród których 82,2% stanowił *S. aureus*, 13,3% – *S. intermedius*, natomiast 4,5% – gronkowce CNS. Autorzy ci badali pod kątem enterotoksyczności jedynie dwie pierwsze grupy, pomijając szczepy należące do gronkowców koagulazoujemnych. Ponadto Cunha i Calsolari [2007] stwierdzili, że istnieją rozbieżności dotyczące enteroto-

ksyczości szczepów CNS, ich zdolności do wywołania intoksykacji oraz zaostrzania innych chorób. Aby w pełni przeciwdziałać zatruciom o etiologii gronkowcowej, należałoby wprowadzić nowe procedury, obejmujące badania pozostałych, potencjalnie enterotoksycznych gatunków gronkowców. Obecnie dostępne testy (np. komercyjny test SET-RPLA), wykorzystywane do rutynowego wykrywania enterotoksycznych gronkowców, umożliwiają oznaczenie jedynie enterotoksyn od A do D [Kochman i in. 2005]. Dodatkowo wiele, z tzw. nowych enterotoksyn, nie wykazuje efektu enterotoksycznego podczas badań przeprowadzanych na zwierzętach laboratoryjnych, co może mieć związek z gatunkową i osobniczą odpornością, a jednocześnie brakiem ich wykrywania [Nawrotek i in. 2005, Ono i in. 2008].

Cunha i Calsolari [2007] stwierdzili, że metoda immunologiczna umożliwiła wykrycie tylko 38,3% enterotoksycznych szczepów gronkowców koagulazoujemnych, podczas gdy z użyciem testu PCR zidentyfikowano geny *se* u 46,6% izolatów. Podobne wyniki uzyskali inni autorzy, m.in. Klotz i in. [2003], którzy porównywali metodę SET-RPLA z techniką real-time TaqMan PCR, uzyskując o 24,1% więcej *se*-dodatnich szczepów w przypadku testu PCR oraz Bystroń i in. [2006], używając komercyjnego testu ELISA i metody multipleks PCR (o 11,5% więcej *se*-dodatnich szczepów). Słabą wykrywalność można tłumaczyć niską czułością dostępnych testów immunologicznych, bądź też wysoką zmiennością enterotoksyn [Becker i in. 2001]. Jednocześnie należy pamiętać, że wykrycie obecności genu (-ów) nie musi być jednoznaczne z potwierdzeniem zdolności szczepu do wytwarzania toksyny.

Obecnie prowadzone badania ograniczają się głównie do stwierdzenia obecności genów *se*. Podczas badań, przeprowadzonych w Brazylii w 2006 roku, stwierdzono obecność genów *se* u 10% wyizolowanych z żywności szczepów CNS [Cunha i Calsolari 2007]. Większość (75%) charakteryzowała się obecnością genu *sea*, natomiast 25% zawierała gen *sec*₁. Z kolei w przypadku takich gatunków jak: *S. hominis*, *S. warneri*, *S. saprophyticus*, *S. epidermidis*, *S. xylosus*, *S. haemolyticus* oraz *S. schleiferi* wykryto geny *sea*, *seb*, *sec* oraz *tst* [Cunha i Calsolari 2007]. Najnowsze badania, przeprowadzone przez Rall i in. [2010], podczas których pobierano wymazy z nosa i dłoni brazylijskich sprzedawców żywności, nie tylko potwierdziły obecność w materiale genetycznym szczepów CNS genów klasycznych enterotoksyn, ale także geny nowych SEs. Prawie 50% koagulazoujemnych gronkowców charakteryzowała obecność co najmniej jednego genu *se*. Co ciekawe, najczęściej występował gen *selj* (31%) i kolejno *sea*, *seh* (24,1%), *seb* (17,2%), *see* (13,8%), *sec* (6,9%) oraz *seg* i *sei* (3,4%) [Rall i in. 2010]. Z kolei wyniki badań innych autorów [Fueyo i in. 2005, Ławrynowicz-Paciorek i in. 2006] dowodzą, że geny kodujące klasyczne enterotoksyny (SEA-SEE) występują w genomie przeważającej liczby szczepów *S. aureus*, obok genów kodujących nowe SEs (SEG-SEIV). Tylko nieliczne szczepy gronkowca złocistego nie posiadają genów nowych SEs. Podobną zależność zaobserwowano w przypadku zidentyfikowanych w niniejszej pracy *se*-dodatnich szczepów *S. xylosus*. Cztery spośród siedmiu wykrytych szczepów charakteryzowały się obecnością zarówno genu *sea*, jak i jednego z bliżej nieokreślonych genów *se* (*seg*, *seh*, *sei* lub *selu*), albo ich wariantów (tab. 1).

Tabela 1. Masy molekularne (pz) ampikonów genów *se*, zidentyfikowanych u siedmiu enterotoksynogennych szczepów *S. xylosus*, ustalone z wykorzystaniem systemu do dokumentacji i analizy żeli – IG/LHR InGenius LHR (Syngene Bio Imaging) oraz oprogramowania GeneSnap i GeneTools (Syngene)

Table 1. Molecular weight (bp) of amplicons of *se* genes, identified in seven enterotoxigenic *S. xylosus* strains, determined using gel documentation and analysis system – IG/LHR InGenius LHR (Syngene Bio Imaging) with GeneSnap and GeneTools software (Syngene)

Numer szczepu Strain number	Masa molekularna (pz) Molecular weight (bp)	Geny <i>se</i> <i>se</i> genes
1	390	<i>se</i> *
	272	<i>sea</i>
2	743***	<i>sed</i>
	389	<i>se</i> *
	266	<i>sea</i>
8	360	<i>se</i> *
	381	<i>se</i> *
9	270	<i>sea</i>
	271	<i>sea</i>
14	271	<i>sea</i>
15	138	<i>se</i> <i>cv</i>
	374	<i>se</i> *
16	288	<i>sea</i>
	189	<i>se</i> **

* bliżej nieokreślony ampikon wskazujący (na podstawie analizy *in silico*) na obecność jednego z genów: *seg*, *seh* lub *sei* (albo ich wariantów), ** bliżej nieokreślony ampikon wskazujący (na podstawie analizy *in silico*) na obecność genu *selu* lub jego wariantu, *** „ekstra produkt”.

* unidentified amplicon suggesting the presence of genes: *seg*, *seh* or *sei* (including genes variants) – on the basis of *in silico* analysis, ** unidentified amplicon suggesting the presence of *selu* gene or variant of that gene – on the basis of *in silico* analysis, *** „extra product”.

Rozpowszechnienie genów enterotoksyn gronkowcowych wśród gronkowców zwiększa wirulencję tych bakterii. Łatwość pozyskiwania genów *se* jest związana z ich lokalizacją. Wyspy patogenności, fagi, transpozony oraz plazmidy są mobilnymi elementami genetycznymi. Ponadto z każdym nowym, ruchomym elementem genetycznym gronkowca może pozyskać kilka różnych genów *se* [Fueyo i in. 2005]. Wang i in. [2009] przeprowadzili badania polegające na określeniu częstości występowania głównych genów kodujących SAGs wśród szczepów *S. aureus*, wyizolowanych z mleka krów z podklinicznym *mastitis*, pochodzących z dwóch głównych regionów mleczarskich w Chinach. Stwierdzili, że gronkowce te różnią się zarówno pod względem występowania genów poszczególnych enterotoksyn, jak i dominujących genotypów. Co ciekawe, uzyskane przez badaczy wyniki mogą świadczyć o obecności wariantów, bądź nowych typów MGEs odpowiedzialnych za „przechowywanie” genów *se* [Wang i in. 2009].

Aktualnie coraz większą uwagę badaczy przyciąga chorobotwórczy potencjał gronkowców koagulazoujemnych. Uzyskane wyniki badań potwierdzają konieczność uwzględnienia w ich diagnostyce wykrywania genów determinujących wytwarzanie enterotoksyn. Enterotoksynogenność gronkowców może zwiększać ryzyko rozprzestrzeniania się tego czynnika zjadliwości w środowisku drogą horyzontalnego transferu genów. Ponadto wykrycie obecności genów *se* w DNA zidentyfikowanych szczepów *S. xylosus*, wyizolowanych od krów z zapaleniem wymienia, wskazuje na potencjalną możliwość udziału szczepów CNS w etiopatogenezie tego schorzenia, a także ich rolę w procesie kontaminacji żywności oraz intoksykacji. Zaprezentowana metoda multipleks PCR może być wykorzystywana do wykrywania nowych genów *se* i (lub) ich wariantów w genomie potencjalnie enterotoksycznych szczepów *Staphylococcus* spp., stanowiąc cenne uzupełnienie innych metod diagnostycznych.

PIŚMIENNICTWO

- Asao T., Kumeda Y., Kawai T., Shibata T., Oda H., Haruki K., Nakazawa H., Kozaki S., 2003. An extensive outbreak of staphylococcal food poisoning due to low-fat milk in Japan: estimation of enterotoxin A in the incriminated milk and powdered skim milk. *Epidemiol. Infect.* 130 (12), 33–40.
- Becker K., Keller B., Eiff C., Brück M., Lubritz G., Etienne J., Peters G., 2001. Enterotoxigenic potential of *Staphylococcus intermedius*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67 (12), 5551–5557.
- Bhatia A., Zahoor S., 2007. *Staphylococcus aureus* enterotoxins: a review. *J. Clin. Diagn. Res.* 1 (2), 188–197.
- Brody T., Yavatkar A.S., Lin Y., Ross J., Kuzin A., Kundu M., Fann Y., Odenwald W.F., 2008. Horizontal gene transfers link a human MRSA pathogen to contagious bovine mastitis bacteria. *PLoS ONE* 3 (8), 1–8.
- Bystron J., Bania J., Żarczyńska A., Korzekwa K., Molenda J., Kosek-Paszkowska K., 2006. Detection of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* strains using a commercial Elisa and Multiplex-PCR. *Bull. Vet. Inst. Pulawy* 50, 329–333.
- Cunha M.L.R.S., Calsolari R.A.O., 2007. Toxigenicity in *Staphylococcus* with emphasis on coagulase-negative staphylococci. *Communicating current research and educational topics and trends in Applied Microbiology* 2, 778–782.
- Fueyo J.M., Mendoza M.C., Rodicio M.R., Muñoz J., Alvarez M.A., Martín M.C., 2005. Cytotoxin and pyrogenic toxin superantigen gene profiles of *Staphylococcus aureus* associated with subclinical mastitis in dairy cows and relationships with macrorestriction genomic profiles. *J. Clin. Microbiol.* 43 (3), 1278–1284.
- Gaillot O., Wetsch M., Fortineau N., Berche P., 2000. Evaluation of CHROMagar Staph. aureus, a new chromogenic medium, for isolation and presumptive identification of *Staphylococcus aureus* from human clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* 38 (4), 1587–1591.
- Garcia M.L., Moreno B., Bergdoll M.S., 1980. Characterization of staphylococci isolated from mastitic cows in Spain. *Appl. Environ. Microbiol.* 39 (3), 548–553.
- Hill W.E., 1996. The polymerase chain reaction: applications for the detection of foodborne pathogens. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 36 (1–2), 123–173.

- Iacumin L., Comi G., Cantoni C., Cocolin L., 2006. Molecular and technological characterization of *Staphylococcus xylosus* isolated from naturally fermented Italian sausages by RAPD, Rep-PCR and Sau-PCR analysis. *Meat Sci.* 74, 281–288.
- Klotz M., Opper S., Heeg K., Zimmermann S., 2003. Detection of *Staphylococcus aureus* enterotoxins A to D by Real-Time fluorescence PCR assay. *J. Clin. Microbiol.* 41 (10), 4683–4687.
- Kochman M., Ławrynowicz-Paciorek M., Piekarska K., Magdziak A., Kałużewski S., 2005. Charakterystyka szczepów *Staphylococcus aureus* izolowanych z próbek żywności. *Med. Dośw. Mikrobiol.* 57, 241–246.
- Koział J., Maciąg-Gudowska A., Potempa J., 2008. *Staphylococcus aureus* jako wewnątrzkomórkowy patogen komórek układu immunologicznego. *Postępy Mikrobiol.* 47 (3), 393–399.
- Kuźma K., Malinowski E., Lassa H., Kłossowska A., 2005. Wytwarzanie enterotoksyn oraz toksyny zespołu wstrząsu toksycznego przez szczepy *Staphylococcus aureus* izolowane z mastitis u krów. *Med. Weter.* 61 (3), 282–284.
- Lamprell H., Villard L., Chamba J.-F., Beuvier E., Borges E., Maurin F., Mazerolles G., Noel Y., Kodjo A., 2004. Identification and biotyping of coagulase positive staphylococci (CPS) in ripened French raw milk cheeses and their *in vitro* ability to produce enterotoxins. *Revue Méd. Vét.* 155 (2), 92–96.
- Letertre C., Perelle S., Dilasser F., Fach P., 2003. A strategy based on 5' nuclease multiplex PCR to detect enterotoxin genes *sea* to *sej* of *Staphylococcus aureus*. *Mol. Cell. Probes.* 17 (5), 227–235.
- Loir Y.L., Baron F., Gautier M., 2003. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genet. Mol. Res.* 2 (1), 63–76.
- Ławrynowicz-Paciorek M., Kocham M., Piekarska K., Wyrębiak A., Potracka E., Leniak-Chmiel U., Magdziak A., 2006. Występowanie enterotoksyn u szczepów *Staphylococcus aureus* izolowanych od chorych hospitalizowanych i nosicieli. *Med. Dośw. Mikrobiol.* 58 (4), 275–281.
- Malinowski E., Gajewski Z., 2009. Charakterystyka zapaleń gruczołu mlekowego u krów wywołanych przez odżywnościowe patogeny człowieka. *Życie Weter.* 84 (4), 290–294.
- Nawrotek P., Borkowski J., Boroń-Kaczmarek A., Furowicz A.J., 2005. Charakterystyka enterotoksyn gronkowcowych wytwarzanych przez szczepy izolowane od krów z zapaleniem gruczołu mlekowego (*mastitis*), z uwzględnieniem elementów epidemiologicznych. *Prz. Epidemiol.* 59, 891–902.
- Nedelkov D., Nelson R.W., 2003. Detection of staphylococcal enterotoxin B via Biomolecular interaction analysis mass spectrometry. *Appl. Environ. Microbiol.* 69 (9), 5212–5215.
- Omoe K., Hu D.-L., Takahashi-Omoe H., Nakane A., Shinagawa K., 2003. Identification and characterization of a new staphylococcal enterotoxin-related putative toxin encoded by two kinds of plasmids. *Infect. Immun.* 71 (10), 6088–6094.
- Ono H.K., Omoe K., Imanishi K., Iwakabe Y., Hu D.-L., Kato H., Saito N., Nakane A., Uchiyama T., Shinagawa K., 2008. Identification and characterization of two novel staphylococcal enterotoxins, types S and T. *Infect. Immun.* 76 (11), 4999–5005.
- Orwin P.M., Leung D.Y.M., Donahue H.L., Novick R.P., Schlievert P.M., 2001. Biochemical and biological properties of staphylococcal enterotoxin K. *Infect. Immun.* 69 (1), 360–366.
- Rall V.L.M., Sforzini J.M., Augustini V.C.M., Watanabe M.T., Fernandes Jr. A., Rall R., Silva M.G., Araújo Jr. J.P., 2010. Detection of enterotoxin genes of *Staphylococcus* sp isolated from nasal cavities and hands of food handlers. *Braz. J. Microbiol.* 41 (1), 59–65.

- Seo K.S., Park J.Y., Terman D.S., Bohach G.A., 2010. A quantitative real time PCR method to analyze T cell receptor V β subgroup expansion by staphylococcal superantigens. *J. Transl. Med.* 7 (8), 1–31.
- Sharma N.K., Rees C.E.D., Dodd C.E.R., 2000. Development of a single-reaction multiplex PCR toxin typing assay for *Staphylococcus aureus* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 66 (4), 1347–1353.
- Sibbald M.J.J.B., Ziebandt A.K., Engelmann S., Hecker M., Jong A., Harmsen H.J.M., Raangs G.C., Stokroos I., Arends J.P., Dubois J.Y.F., Dijn J.M., 2006. Mapping the pathways to staphylococcal pathogenesis by comparative secretomics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70 (3), 755–788.
- Thomas D.Y., Jarraud S., Lemercier B., Cozon G., Echasserieau K., Etienne J., Gougeon M.-L., Lina G., Vandenesch F., 2006. Staphylococcal enterotoxin-like toxins U2 and V, two new staphylococcal superantigens arising from recombination within the enterotoxin gene cluster. *Infect. Immun.* 74 (8), 4724–4734.
- Tietze M., Hunc D., Bryl M., 2004. Zdrowotność gruczołu mlekowego i stan sanitarny surowego mleka zbiorczego w gospodarstwach specjalistycznych Podkarpacia. *Zesz. Nauk. Akad. Rol. Wroc. Zootechnika LI* (501), 325–330.
- Udo E.E., Al-Bustan M.A., Jacob L.E., Chugh T.D., 1999. Enterotoxin production by coagulase-negative staphylococci in restaurant workers from Kuwait City may be a potential cause of food poisoning. *J. Med. Microbiol.* 48, 819–823.
- Wang S.-C., Wu C.-M., Xia S.-C., Qi Y.-H., Xia L.-N., Shen J.-Z., 2009. Distribution of superantigenic toxin genes in *Staphylococcus aureus* isolates from milk samples of bovine subclinical mastitis cases in two major dairy production regions of China. *Vet. Microbiol.* 137 (3–4), 276–281.
- Wilson I.G., Cooper J.E., Gilmour A., 1991. Detection of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in dried skimmed milk: use of the polymerase chain reaction for amplification and detection of staphylococcal genes *entB* and *entC1* and the thermonuclease gene *nuc*. *Appl. Environ. Microbiol.* 57 (6), 1793–1798.

DETECTION OF ENTEROTOXIGENIC *STAPHYLOCOCCUS* SPP. STRAINS, ISOLATED FROM COWS WITH MASTITIS, USING MULTIPLEX-PCR

Abstract. The aim of the study was the identification and molecular analysis of 35 *Staphylococcus* spp. strains, isolated from milk of cows with clinical form of mastitis, regarding to its potential ability to produce enterotoxins (SEA-SEE). All examined strains were first characterized on the basis of the image analysis of the bacterial colony growth on chromogenic medium CHROMagar Staph. aureus. In the next step all strains were analyzed using the species-specific PCR, based on detection of two molecular markers: *nuc* – specific for *S. aureus* and *gehM* – specific for *S. xylosum*. Additionally, enterotoxigenicity of identified strains (presence of *sea-see* genes, including *secv*), in the multiplex-PCR was performed. A total of 35 isolates from milk samples of bovine clinical mastitis cases were analyzed and 18 strains (51.4%) classified as *S. xylosum* (CNS), where only two strains (5.7%) were coagulase-positive *S. aureus*. Seven isolates of *S. xylosum* (20%) were positive for enterotoxin genes (*se*), as detected by multiplex-polymerase chain reaction, with *sea* (71.4%), *secv* (14.3%) and *sed* (14.3%). In addition, in the case of five strains (71.4%), amplicons specific for others, indefinable *se* genes or their variants were detected, which on the basis of in silico analysis were identified as: *seg*, *seh*, *sei* or *selu*. The data

showed that the toxigenic properties of CNS should not be ignored and further investigation of this group of microorganisms in food could be very important. Moreover the research contributed to emphasize the meaning of enterotoxigenic *S. xylosus* strains in the etiology of cows' mastitis. The study also confirmed the usefulness of molecular methods in detection of potentially enterotoxic *Staphylococcus* spp. strains, isolated from animals.

Key words: coagulase-negative staphylococci, enterotoxin genes, mastitis, multiplex-PCR, *S. xylosus*, *Staphylococcus* spp.

Zaakceptowano do druku – Accepted for print: 26.10.2010