

Received: 07.08.2018
Accepted: 30.01.2019
Published: 15.05.2019

Metody genetyczne stosowane w typowaniu epidemiologicznym *Staphylococcus aureus*

Genotypic methods for epidemiological typing of *Staphylococcus aureus*

Martyna Kasela¹, Anna Malm¹, Bożena Nowakowicz-Dębek², Mateusz Ossowski³

¹Katedra i Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej z Pracownią Diagnostyki Mikrobiologicznej Uniwersytetu Medycznego w Lublinie

²Katedra Higieny Zwierząt i Zagrożeń Środowiska, Zakład Zagrożeń Zawodowych i Środowiskowych Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie

³Katedra Higieny Zwierząt i Zagrożeń Środowiska Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie

Streszczenie

Staphylococcus aureus jest ważnym patogenem powodującym zakażenia szpitalne i pozaszpitalne. Bakteria ta bardzo często charakteryzuje się opornością na powszechnie stosowane leki przeciwdrobnoustrojowe. Z tego powodu opracowanie szybkich technik identyfikacji, jak i genotypowania jest konieczne do efektywnej kontroli rozprzestrzeniania się szczepów wielolekoopornych nieraz przyczyniających się do powstawania epidemii. Metody typowania można podzielić na te opierające się na cechach fenotypowych lub genetycznych badanego drobnoustroju. Wśród metod genotypowych użytecznych w badaniach epidemiologicznych *S. aureus* znalazły się: analiza profili plazmidowych (PPA), analiza restrykcyjna chromosomowego DNA połączona z elektroforezą pulsową (PFGE), sekwencjonowanie genów metabolizmu podstawowego (MLST), typowanie spa, losowa amplifikacja polimorficznego DNA (RAPD), selektywna amplifikacja fragmentów restrykcyjnych (AFLP), polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP), typowanie oparte o sekwencje VNTR (MLVA) oraz sekwencjonowanie całego genomu (WGS). Omówione zostały aspekty odtwarzalności i powtarzalności wyników uzyskanych tymi metodami, porównano je także pod kątem kosztów, szybkości analizy czy potencjału różnicującego oraz podano przykłady ich zastosowań w badaniach epidemiologicznych *S. aureus*. Mimo że dostępnych jest wiele technik stosowanych w typowaniu szczepów *S. aureus*, nie wszystkie spełniają wymogi stawiane przez dochodzenia epidemiologiczne o różnym charakterze. Ze względu na dużą liczbę uzyskiwanych danych i ciągły spadek kosztów przeprowadzenia analizy, do najpopularniejszych obecnie metod genotypowania *S. aureus* należą oparte na technice sekwencjonowania.

Słowa kluczowe:

metody genotypowe • genotypowanie • epidemiologia molekularna • *Staphylococcus aureus*

Summary

Staphylococcus aureus is an important pathogen causing both hospital and community-acquired infections. *S. aureus* strains are often resistant to commonly used antibiotics, thus development of techniques to rapidly identify and genotype is essential in order to control the dissemination of multidrug resistant strains of *S. aureus* in the environment, which could lead to an epidemic. Typing methods can be divided into those based on phenotypic and those based on genetic characteristics of the examined microorganism. The most reliable genotypic methods in *S. aureus* epidemiological studies were described. These would include the following: Plasmid

	Profile Analysis (PPA), Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE), Multi-Locus Sequence Typing (MLST), Spa Typing, Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD), Amplified-Fragment Length Polymorphism (AFLP), Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP), Multiple-Locus Variable Number Tandem Repeat Analysis (MLVA) and Whole Genome Sequencing (WGS). All of these methods have been compared in terms of their reproducibility, costs, time of analysis, differentiation potential and exemplary applications in epidemiological studies of <i>S. aureus</i> . Despite there being a variety of methods currently used for genotyping, not all of them meet the criteria set by different kinds of epidemiological investigations. Because of the large amount of generated data and decrease of costs, the most popular methods used for <i>S. aureus</i> genotyping are based on sequencing techniques.
Keywords:	genotypic methods • genotyping • molecular epidemiology • <i>Staphylococcus aureus</i>
GICID	01.3001.0013.2020
DOI:	10.5604/01.3001.0013.2020
Word count:	4480
Tables:	2
Figures:	–
References:	55

Adres autorki: mgr Martyna Kasela, Katedra i Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej z Pracownią Diagnostyki Mikrobiologicznej Uniwersytetu Medycznego w Lublinie, ul. Chodźki 1, 20-093 Lublin, e-mail: martynakasela@umlub.pl

Wykaz skrótów: **AA-MRSA** – odzwierzęce metycylinooporne *S. aureus* (animal-associated methicillin resistant *Staphylococcus aureus*); **AFLP** – selektywna amplifikacja fragmentów restrykcyjnych (amplified-fragment length polymorphism); **CA-MRSA** – pozaszpitalne metycylinooporne *S. aureus* (community-associated methicillin-resistant *S. aureus*); **CC** kompleks klonalny (clonal complex); **HA-MRSA** – szpitalne metycylinooporne *S. aureus* (hospital-associated methicillin-resistant *S. aureus*); **IUMS** – Międzynarodowa Unia Towarzystw Mikrobiologicznych (International Union of Microbiological Societies); **LA-MRSA** – metycylinooporne *S. aureus* pochodzące od trzody chlewnej (livestock-associated methicillin-resistant *S. aureus*); **LM-PCR** – PCR oparte o ligację adaptorów (ligation mediated PCR); **MLST** – sekwencjonowanie genów metabolizmu podstawowego (multilocus sequence typing); **MLVA** – typowanie oparte o sekwencje VNTR (multiple-locus variable number tandem repeat analysis); **MSSA** – metycylinowrażliwe *S. aureus* (methicillin susceptible *S. aureus*); **NGS** – sekwencjonowanie drugiej generacji (next generation sequencing); **PFGE** – analiza restrykcyjna chromosomowego DNA połączona z elektroforezą pulsową (pulse-field gel electrophoresis); **PPA** – analiza DNA plazmidowego (Panton-Valentin leucocidin, leukocydyna Panton-Valentin pulse-field gel electrophoresis); **pz** – para zasad; **RAPD** – losowa amplifikacja polimorficznego DNA (random amplifies polymorphic DNA); **RFLP** – polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych (restriction fragment length polymorphism); **SLST** – sekwencjonowanie pojedynczego *locus* (single locus sequence typing); **ST** – typ sekwencyjny (sequence type); **TGS** – sekwencjonowanie trzeciej generacji (third generation sequencing); **VNTR** – zmienna liczba powtórzeń tandemowych (variable number tandem repeats); **VRSA** – wankomycynooporne *S. aureus* (vancomycin resistant *S. aureus*); **WGS** – sekwencjonowanie całego genomu (whole genome sequencing).

WSTĘP

Staphylococcus aureus jest ważnym patogenem człowieka, obecnym zarówno w środowisku szpitalnym, jak i pozaszpitalnym [15]. Jest czynnikiem etiologicznym infekcji skóry, tkanek miękkich, zwłaszcza ran

pooperacyjnych; powoduje także zakażenia szpiku kostnego czy bakteriemie. *S. aureus* znany jest również z bardzo szybkiego nabywania cech lekooporności [8]. Zakażenia o etiologii MRSA, czyli te spowodowane przez szczepy *S. aureus* odporne na działanie antybiotyków β-laktamowych są problemem na skalę globalną,

czemu towarzyszy znaczne obciążenie finansowe placówek medycznych [21]. Infekcje szpitalne wywołane przez ten patogen wiążą się ze wzrostem wskaźników zachorowalności i śmiertelności wśród pacjentów [25]. Należy pamiętać, iż *S. aureus* jest składnikiem mikrobioty skóry i błon fizjologicznych człowieka. Szacuje się, że 30-60% osób jest stałymi bądź przejściowymi nosicielami tego mikroorganizmu w jamie nosowej. Nosicielstwo szczepów wielolekoopornych może mieć znaczenie w powstawaniu ognisk epidemicznych [39].

Istnieje wiele metod, które znalazły zastosowanie w identyfikacji *S. aureus*. Metody fenotypowe: biochemiczne (np. system VITEK) czy te oparte na analizie białek badanych izolatów (np. MALDI-TOF MS), dzięki automatyzacji, dużej przepustowości (zdolności do analizy dużej liczby próbek w krótkim czasie) i niskim kosztem badania są stosowane w rutynowej diagnostyce mikrobiologicznej, natomiast metody genetyczne (wykrywanie genu *coa* czy sekwencjonowanie podjednostki 16s rRNA) w badaniach naukowych [16, 40]. Obecnie w obrębie gatunku *S. aureus* wyróżnia się dwa podgatunki: *S. aureus subsp. aureus* – obecny w terminologii jako *S. aureus* oraz *S. aureus subsp. anaerobius* – będący czynnikiem etiologicznym choroby Morela u owiec, bardzo rzadko powodujący ropnie u ludzi [10].

Metody genotypowe są oparte na analizie materiału genetycznego drobnoustrojów – DNA chromosomowego i/lub plazmidowego pod kątem budowy strukturalnej, homologii między badanymi izolatami czy braku bądź obecności swoistych genów, a ich celem jest określenie stopnia pokrewieństwa szczepów w obrębie jednego gatunku drobnoustroju [45]. Metodą badającą DNA pochodzenia plazmidowego jest analiza profili plazmidowych – PPA. Jest jednak stosowana rzadko ze względu na niski potencjał różnicujący (zdolność rozróżnienia dwóch niespokrewnionych izolatów). Za pomocą PPA duża część plazmidów szczepów MRSA i MSSA nie zostaje wykryta, a główną przyczyną jest mała liczba ich kopii w pojedynczej komórce [42, 51]. Genotypowanie szczepów *S. aureus* jest procesem niezbędnym mającym na celu charakterystykę rozprzestrzeniania się izolatów wielolekoopornych, w tym klonów MRSA, mających obecnie największe znaczenie w epidemiologii [55]. W porównaniu do metod fenotypowych, metody opierające się na analizie materiału genetycznego drobnoustrojów są powszechnie uznawane za bardziej czułe, szybsze i wiarygodniejsze [18]. Najważniejsze parametry, według których metody genotypowania są porównywane to typowość, powtarzalność i odtwarzalność oraz potencjał różnicujący [14]. W badaniach epidemiologicznych dotyczących szczepów *S. aureus* rzadko jest stosowana tylko jedna metoda typowania molekularnego. Zazwyczaj stosuje się co najmniej dwie różne techniki genotypowania, co pozwala na bardziej szczegółową i wiarygodną analizę izolatów [22].

Wyniki dalszych badań nad epidemiologią *S. aureus* zależą w dużej mierze od rozwiązania aktualnych problemów związanych z metodami typowania drobnoustrojów.

Nadzieją są szybko rozwijające się techniki genotypowania oparte na sekwencjonowaniu, które zapewniają wiele informacji na temat organizacji całego materiału genetycznego *S. aureus*. Największe znaczenie wydają się mieć badania długoterminowe, gdyż ich wyniki pozwalają w dużym stopniu na przewidywanie scenariuszy rozprzestrzeniania się klonów *S. aureus*, a co za tym idzie umożliwiają opracowanie programów zapobiegania powstawania ognisk infekcyjnych w środowisku zarówno szpitalnym, jak i pozaszpitalnym [53].

ANALIZA RESTRYKCYJNA CHROMOSOMOWEGO DNA POŁĄCZONA Z ELEKTROFOREZĄ PULSOWĄ (PFGE)

Analiza restrykcyjna chromosomowego DNA połączona z elektroforezą pulsową, czyli PFGE, przez większość badaczy nadal jest uważana za złoty standard w typowaniu drobnoustrojów [11, 19, 36, 37, 46, 47]. Już w latach 90 XX w. zastąpiła typowanie fagowe jako narzędzie do badań epidemiologicznych [46]. PFGE jest najczęściej stosowaną metodą w badaniu epidemiologii lokalnie występujących szczepów *S. aureus* i badań krótkoterminowych [4] oraz jest metodą z wyboru w „DNA fingerprinting” MRSA [26]. Jest to metoda analizująca cały materiał genetyczny komórki bakteryjnej [2, 19]. Polega na trawieniu rzadko tnącymi enzymami restrykcyjnymi i rozdziale powstałych fragmentów DNA [2, 36]. Wynikiem zastosowania odpowiednio dobranych enzymów jest uzyskanie dużych fragmentów o wielkości 50000-250000 pz [46]. Ze względu na wielkość uzyskanych fragmentów, do ich rozdziału nie nadaje się konwencjonalny rozdział elektroforetyczny i wymagany jest specjalistyczny sprzęt do przeprowadzenia elektroforezy oraz zastosowanie zmiennego pola elektrycznego [2]. Liczba fragmentów DNA zależy od długości rozpoznawanej przez enzym restrykcyjny sekwencji oraz procentowej zawartości par zasad GC w trawionym DNA [19]. Na uzyskany wzór elektroforetyczny wpływają także delecje, insercje i mutacje punktowe w badanym materiale genetycznym [52].

Ze względu na niewielką liczbę uzyskanych fragmentów jest to metoda znacznie prostsza niż RFLP. Dla porównania, enzym *Hind III* stosowany w metodzie RFLP tnie genom *S. aureus* na ponad 1000 fragmentów, podczas gdy zastosowanie enzymu *Sma I* w PFGE powoduje powstanie 25 fragmentów [2]. Najczęściej stosowanymi enzymami restrykcyjnymi do badania *S. aureus* metodą PFGE są *Sma I* i *Csp I*. Szczepy, które mają takie same wzory restrykcyjne zalicza się do tego samego typu makrorestrykcyjnego czy typu PFGE. Szczepy, u których we wzorze zaobserwowano różnice jednego czy dwóch prążków korespondujących ze zmianami w genomie (insercje, delecje, mutacje punktowe powodujące stratę lub zysk miejsca restrykcyjnego) są przypisywane do subtypów, a izolaty różniące się trzema i więcej prążkami do różnych typów PFGE. W ten sposób możliwe jest ustalenie genetycznych powiązań między badanymi izolatami w badaniach epidemiologicznych [7].

Analiza DNA chromosomowego za pomocą PFGE jest uznawana za metodę użyteczną w dochodzeniu źródeł, dróg transmisji i rozpowszechniania szpitalnych szczepów MRSA. Metoda ta pozwala na wgląd w całościowy obraz organizacji genomu bakteryjnego [1] oraz jest metodą odniesienia do opracowania nowych technik biologii molekularnych typowania drobnoustrojów [11]. PFGE ma bardzo duży potencjał różnicujący i można jej użyć do typowania wszystkich drobnoustrojów [1, 19, 47]. Ma także najlepiej wystandaryzowane protokoły, jeśli chodzi o badania epidemiologiczne MRSA [39]. Schemat klasyfikacji izolatów do typów powstałych w wyniku uzyskania PFGE, jak i nomenklatura są powszechnie znane i zrozumiałe. W wielu badaniach, gdzie pod uwagę brane były szczepy CA-MRSA, metody PFGE, MLST oraz określanie typu spa izolatu miały porównywalny potencjał dyskryminujący [36]. Niemal wszystkie izolaty *S. aureus* są typowe, a niewielka liczba uzyskanych prążków ułatwia interpretację wyników [46].

Niestety, metoda ma też wady, do których należą m.in. duże koszty, czasochłonność, pracochłonność, konieczność posiadania specjalistycznego sprzętu i stałego nadzoru nad warunkami analizy [11, 47]. Niewielkie różnice w protokołach i parametrach przeprowadzanej elektroforezy mogą być przyczyną niskiej powtarzalności [2, 36]. Fragmenty DNA o podobnej wielkości mogą na siebie nachodzić, utrudniając interpretację obrazu elektroforetycznego. Obraz zaburzać mogą także fragmenty DNA plazmidowego. Do przeprowadzenia analizy potrzebna jest także droga aparatura i odczynniki, a jej czas trwania wynosi 2-4 dni [19, 46]. Istotnym ograniczeniem jest także pojawianie się izolatów, nietypowych, tj. odzwierzęcy klon ST398 [52] czy szczepy AA-MRSA występujące głównie w Azji, Europie i Ameryce Północnej, cechujące się metylacją miejsca restrykcyjnego dla enzymu restrykcyjnego *Sma* I [35]. PFGE znalazło zastosowanie w charakterystyce powiązań między rzadziej badanymi *S. aureus subsp. anaerobius* i *S. aureus subsp. aureus* [50] oraz umożliwia rozróżnianie szczepów MRSA i daje szeroki wgląd

w mechanizmy ich transmisji, a jej wyniki mogą stanowić podstawę do opracowania działań prewencyjnych, mających na celu ograniczenie ich rozpowszechniania się [27].

SEKWENCJONOWANIE GENÓW METABOLIZMU PODSTAWOWEGO (MLST)

MLST to obecnie podstawowa metoda typowania szczepów MRSA do celów epidemiologicznych [27]. Polega na zsekwencjonowaniu polimorficznych regionów siedmiu genów metabolizmu podstawowego o długości 450-500 pz, uzyskanych wcześniej za pomocą reakcji PCR. Uwzględniając to, że geny metabolizmu podstawowego są niezbędne do życia komórki bakteryjnej, są zawsze obecne w badanym materiale genetycznym [2]. Typ ST jest określany przez porównanie uzyskanych wariantów siedmiu genów z sekwencjami zawartymi w bazie danych. Istnieje wiele wariantów każdego genu, dlatego prawdopodobieństwo tego, aby niespokrewnione klony miały taki sam typ sekwencyjny jest bardzo niskie. Izolaty o takich samych profilach allelicznych zaklasyfikowane zostają do tego samego klonu [24, 30, 36, 49]. Do genów standardowo analizowanych u *S. aureus* należą: *arcC*, *aroE*, *glpF*, *gmk*, *pta*, *tpi* oraz *yqil*, przy czym panel ten może być rozszerzony o następujące: *sasA*, *sasB*, *sasD*, *sasE*, *sasF*, *sasH* i *sasI* [7] (tabela 1). Warto wspomnieć, iż zastosowanie tej metody wymaga użycia specjalistycznego oprogramowania, tj. eBURST, które służy do projektowania ewolucyjnego modelu, zapewniającego badaczom informacje o tym jak powstają i rozprzestrzeniają się klony *S. aureus* [7, 52].

MLST ma duży potencjał różnicujący, bogate bazy danych (www.mlst.net) czy powszechnie nieznaną nomenklaturę [2, 49]. Międzynarodowe nazewnictwo klonów MRSA (np. klon ST22-MRSA-IV, czyli 22 typ sekwencyjny, szczep metycylinooporny zawierający IV typ gronkowcowej kasety chromosomalnej) wykorzystujące określenia używane w metodzie MLST zostało zaakceptowane przez IUMS [4]. Odtwarzalność metody i internetowe bazy danych zapewniają stały dostęp do wyników badań

Tabela 1. Geny *Staphylococcus aureus* analizowane w metodzie MLST i kodowane przez nie białka

Gen	Kodowane białko
<i>arcC</i>	kinaza karbaminianowa
<i>aroE</i>	dehydrogenaza Shikimate
<i>glpF</i>	kinaza glicerolowa
<i>gmk</i>	kinaza guanylanowa
<i>pta</i>	acetylotransferaza fosforanowa
<i>tpi</i>	izomeraza triozofosforanowa
<i>yqil</i>	acetylotransferaza acetylokoenzymu A
<i>sasABDEFHI</i>	białka powierzchniowe odpowiedzialne za adhezję i proces formowania się biofilmu

Według [3, 7, www.mlst.net].

z całego świata, dzięki czemu porównania międzylaboratoryjne nie sprawiają trudności [19, 34, 35, 49]. MLST jest metodą stosowaną głównie w badaniach długoterminowych, ponieważ wykrywa różnice materiału genetycznego, które wolno gromadzą się w genomie [34, 54]. Pozwala m.in. na identyfikację oraz rozróżnienie szczepów MRSA i MSSA pochodzących zarówno ze środowiska szpitalnego, jak i pozaszpitalnego [19], prowadzenie dochodzeń o rozpowszechnianiu klonów *S. aureus* [34], studiowanie ewolucji MRSA na skalę globalną [52] czy typowanie szczepów odzwierzęcych LA-MRSA i śledzenie ich transmisji między ludźmi a zwierzętami [46]. Uznaje się ją także za metodę referencyjną stosowaną w charakterystyce struktury genetycznej *S. aureus*, w której dominuje kilkanaście kompleksów klonalnych zawierających kilkaset typów sekwencyjnych [30]. Metoda ma jednak liczne wady. Chcąc wykorzystać MLST do analizy szczepów bliżej spokrewnionych, konieczne może być jednoczesne zastosowanie innych metod, tj. typowanie spa [7, 55]. Poza tym, analizuje tylko część zmienności genomowej i wymaga czystych kultur bakteryjnych. Ze względu na duży nakład pracy, wysokie koszty analizy związane z wykorzystaniem techniki sekwencjonowania oraz ograniczoną dostępnością laboratoriów do techniki sekwencjonowania o dużej przepustowości, nie jest to metoda rutynowo stosowana w analizie ognisk infekcyjnych [49]. Przykładowo, do analizy jednego szczepu konieczne jest przeprowadzenie siedmiu reakcji PCR, po jednej dla każdego genu metabolizmu podstawowego oraz czternastu reakcji sekwencjonowania, po dwie na każdy produkt PCR [2]. Ze względu na te ograniczenia metody, próbuje się zaadaptować inne techniki genotypowe w celu detekcji polimorfizmu genów metabolizmu podstawowego (PCR-RFLP czy mikromacierze DNA) [7].

TYPOWANIE OPARTE O SEKWENCJE VNTR (MLVA)

MLVA jest metodą polegającą na jednoczesnej analizie *loci* zawierających zróżnicowaną liczbę tandemowych powtórzeń. Analiza jednego takiego *loci* zwana jest techniką VNTR. Produkty PCR zostają poddane rozdzielaniu elektroforetycznemu, dzięki czemu otrzymuje się wzór charakterystyczny dla badanego szczepu *S. aureus* [44, 47]. VNTR zostało zaproponowane do genotypowania izolatów *S. aureus* kilka lat temu, uwzględniając gen *coa* kodujący koagulazę, następnie gen *spa* kodujący gronkowcowe białko A. W następnych latach powtórzenia tandemowe obecne w kilku genach były analizowane jednocześnie tworząc charakterystyczne wzory dla badanych szczepów [31]. Genami najczęściej brany pod uwagę przy analizie szczepów *S. aureus* są m.in. *clfB*, *clfA*, kodujące białko A/B wiążące fibrynogen czy gen *spa* [47].

MLVA może się stać metodą odpowiednią do krótkoterminowych badań epidemiologicznych. Konieczne jest jednak opracowanie protokołu, który określi odpowiedni zestaw analizowanych markerów VNTR i starterów. Choć uważa się, że potencjał różnicujący MLVA i PFGE jest podobny, MLVA ma jedną

główną wadę – uzyskane tą metodą profile nie są łatwo porównywalne między laboratoriami, co wiąże się z trudnościami w tworzeniu międzynarodowych baz danych [37]. Badania wykazały doskonałą zgodność między wynikami typowania szczepów *S. aureus* uzyskanymi metodą MLST i MLVA oraz typowaniem spa, przy czym najwyższym potencjałem różnicującym charakteryzowała się właśnie metoda MLVA [31]. W porównaniu do innych metod biologii molekularnej wymaga tylko podstawowego sprzętu [38] oraz opiera się na reakcji PCR, więc jest możliwa do wykonania w wielu laboratoriach [37]. Inne badania wykazały, iż zastosowanie metody MLVA bazującej na zmienności w 8 *loci*, w porównaniu do techniki MLST pozwoliło na poprawne przyporządkowanie nowego izolatu MRSA do kompleksu klonalnego – CC, przy znacznie niższym nakładzie finansowym [44].

LOSOWA AMPLIFIKACJA POLIMORFICZNEGO DNA (RAPD)

Jedną z najpopularniejszych i zarazem najprostszych technik typowania mikroorganizmów jest metoda RAPD. Zasada metody opiera się na losowej amplifikacji w reakcji PCR i wykorzystuje w tym celu oligonukleotydowe startery o długości 9-10 pz. Startery hybrydują z mniej lub bardziej homologicznymi sekwencjami matrycy losowo [29, 47]. Obniżenie swoistości ich przyłączania do matrycy uzyskuje się dzięki obniżeniu temperatury w czasie poszczególnych cykli reakcji PCR. Celem zastosowania metody jest uzyskanie od kilku do kilkudziesięciu fragmentów o długości 100-2000 pz. Tak uzyskany profil elektroforetyczny izolatu obrazuje różnice w sekwencjach, do których przyłącza się starter, różnice w długości powielanych fragmentów oraz różnice w konformacji materiału genetycznego. Im bardziej profile się różnią, tym mniejsze jest pokrewieństwo między badanymi szczepami [47].

W porównaniu do metod biochemicznych typowania drobnoustrojów, jest to metoda szybka, tania i wymagająca zastosowania podstawowej aparatury [29]. Ze względu na bardzo duży wpływ na wyniki metody czynników związanych ze środowiskiem reakcji PCR, tj. stężenie starterów, jakość i stężenie matrycowego DNA, warunki procesu elektroforezy oraz rodzaj zastosowanej polimerazy, porównanie wyników między laboratoriami jest właściwie niemożliwe [19, 39]. Nie ma także ogólnie przyjętych wytycznych o interpretacji wyników [47]. Aby RAPD można było uznać za technikę o optymalnej powtarzalności i odtwarzalności, konieczna jest standaryzacja parametrów technicznych. RAPD jest metodą użyteczną tylko w szybkich badaniach porównawczych niewielkiej liczby szczepów, natomiast nie znajduje zastosowania w szerszych badaniach mających na celu kontrolę rozpowszechniania się szczepów alarmowych i ich typowania [7]. Obecnie metoda jest użyteczna w badaniu pojedynczych ognisk infekcji MRSA, a jej wyniki pozwalają na ocenę stopnia pokrewieństwa szczepów [26].

SELEKTYWNA AMPLIFIKACJA FRAGMENTÓW RESTRYKCYJNYCH (AFLP)

Selektywna amplifikacja fragmentów restrykcyjnych należy do metod opartych na selektywnej amplifikacji fragmentów restrykcyjnych z dołączonymi do nich adaptorami oligonukleotydowymi – LM-PCR [47]. Można wyróżnić cztery etapy AFLP:

- trawienie całego DNA z udziałem dwóch enzymów restrykcyjnych,
- ligacja otrzymanych fragmentów z adaptorami,
- selektywne powielenie produktów ligacji za pomocą starterów homologicznych do sekwencji adaptor-miejsce restrykcyjne,
- rozdział produktów.

Powielane fragmenty są otrzymywane dzięki zastosowaniu enzymów restrykcyjnych [19]. Najczęściej jeden z enzymów charakteryzuje się średnią częstością cięcia (np. *Eco* RI), natomiast drugi jest enzymem często tnącym (np. *Mse* I lub *Tag* I) [41, 47]. Amplifikację prowadzi się z użyciem starterów o takiej samej sekwencji co adaptor, która jest wydłużona na końcu 3' o sekwencje miejsca restrykcyjnego oraz 2-4 selekcyjne nukleotydy. Powielenie fragmentu DNA następuje jedynie wtedy, gdy starter na końcu 3' jest komplementarny do obu stron fragmentu restrykcyjnego [2, 47]. Po elektroforezie w żelu poliakrylamidowym otrzymuje się wzór 40-200 prążków. Takie wzory elektroforetyczne u porównywanych szczepów bakteryjnych wykazują polimorfizm, ponieważ w ich genomach występują mutacje w miejscach restrykcyjnych, mutacje w sekwencjach sąsiadujących do miejsc restrykcyjnych i komplementarnych do wydłużeń starterów oraz insercje lub delecje w obrębie sekwencji nukleotydowych amplifikowanych fragmentów [41].

Metoda AFLP ma duży potencjał różnicujący, jest uniwersalna, stosunkowo prosta w wykonaniu, ale z powodu dużego kosztu analizy, stosowana jest raczej do opisu pojedynczych przypadków zakażeń niż do badań epidemiologicznych na większą skalę [47]. Interpretacja profili jest często problematyczna ze względu na różnice w intensywności prążków, co przekłada się na duże trudności w porównaniach międzylaboratoryjnych [2]. Główną zaletą AFLP jest możliwość wykrycia pojedynczych różnic w genomach organizmów blisko spokrewnionych [7, 19, 47], dlatego znajduje zastosowanie w badaniach ustalających pokrewieństwo szczepów *S. aureus*, w badaniach filogenetycznych czy w badaniach nad horyzontalnym transferem genów [47]. Dzięki tej technice udało się wykazać np. klonalną transmisję szczepów *S. aureus* między członkami rodzin, a ich zwierzętami domowymi, przy czym ustalono także, że to koty i psy były rezerwuarem tej bakterii [41]. Warto wspomnieć, że w niektórych badaniach, tj. różnicowanie szczepów *S. aureus* *subsp. anaerobius* AFLP ma większą siłę dyskryminującą niż metoda PFGE [50].

POLIMORFIZM DŁUGOŚCI FRAGMENTÓW RESTRYKCYJNYCH (RFLP)

W ciągu ostatnich lat RFLP była bardzo często stosowaną metodą typowania drobnoustrojów. W tej technice, całe bakteryjne DNA jest izolowane z czystych kultur, a następnie trawione za pomocą enzymów restrykcyjnych rozpoznających krótkie dwuniciowe sekwencje nukleotydowe. Otrzymane w ten sposób fragmenty są rozdzielane na żelach elektroforetycznych i uwiadaczniane za pomocą barwienia. W związku z dużym stopniem złożoności bakteryjnego genomu, w wyniku zastosowania tej techniki uzyskuje się setki prążków na elektroforegramie, co jest zdecydowanie zbyt dużą liczbą aby typowanie można było uznać za rzetelne. Skutkiem tej zależności jest częste upraszczanie otrzymanego profilu prążków przez zastosowanie sond hybrydyzacyjnych. Takie sondy są znanymi sekwencjami oligonukleotydowymi komplementarnymi do uzyskanych fragmentów DNA. Aby przeprowadzić hybrydyzację, konieczne jest przeniesienie fragmentów DNA z żelu na membranę. Technika ta nosi nazwę hybrydyzacji Southern-blot lub DNA fingerprinting [2]. Natomiast, PCR-RFLP opiera się na analizie szczególnych fragmentów DNA, które najpierw są amplifikowane w reakcji PCR, a następnie poddawane trawieniu za pomocą enzymów restrykcyjnych. Wybór badanego regionu DNA zależy od celu prowadzonej analizy i może nim być sekwencja swoista dla danego gatunku bakterii pozwalająca na identyfikację gatunkową czy region umożliwiający analizę filogenetyczną. PCR-RFLP jest także stosowane do wykrywania pojedynczych mutacji. Wybrany region DNA powinien zawierać sekwencję na tyle zmienną, aby pozwoliło to na rozróżnienie badanych szczepów bakterii. Startery powinny być zaprojektowane do konserwatywnych sekwencji flankujących badany region. Enzymy restrykcyjne często tnące, najczęściej są wybierane tak, aby rozpoznawały sekwencje czteronukleotydowe [9]. W badaniach *S. aureus* do najczęściej analizowanych genów metodą PCR-RFLP należą gen *coa* kodujący koagulazę cięty przez enzym *AluI* czy gen *spa* kodujący białko A cięty przez *RsaI* [7, 43].

Zakres użyteczności tej metody zależy od polimorfizmu analizowanej sekwencji, dlatego może być wykorzystana do rozróżniania szczepów należących do tego samego gatunku [47]. Modyfikacją metody użyteczną w różnicowaniu szczepów *S. aureus* jest *coa*-RFLP. Koagulaza jest jednym z podstawowych białek służących do identyfikacji gatunkowej *S. aureus*. Dalsza analiza genu *coa* za pomocą enzymów restrykcyjnych pozwala na różnicowanie poszczególnych szczepów *S. aureus* [9, 13]. Zaletą metody PCR-RFLP jest mała ilość materiału genetycznego potrzebnego do analizy, co ułatwia typowanie drobnoustrojów trudnych w hodowli konwencjonalnej. W przypadku pozostałych drobnoustrojów zalecana jest wstępna hodowla w celu otrzymania czystych kultur bakteryjnych [2]. PCR-RFLP ma niższy potencjał różnicujący niż metody oparte na technice PFGE. Wzrost potencjału różnicującego PCR-RFLP może zostać uzyskany

przez zastosowanie reakcji multipleks PCR, co pozwala na analizę wielu fragmentów genomu bakteryjnego w tym samym czasie, a następnie zastosowanie kilku enzymów restrykcyjnych. Główną zaletą metody PCR-RFLP jest więc jednoczesne uzyskanie przyporządkowania badanego izolatu co do gatunku, jak i typowanie szczepów [9].

SEKWENCJONOWANIE GENU SPA (TYPOWANIE SPA)

Dzięki szybkości i możliwości porównania wyników uzyskanych w badaniach na całym świecie, sekwencjonowanie genu *spa* jest jedną z najpopularniejszych metod wykorzystywanych w typowaniu szczepów *S. aureus*, w tym MRSA [55]. Metoda ta należy do technik bazujących na sekwencjonowaniu pojedynczego locus - SLST, co oznacza, że opiera się na porównaniu różnic między sekwencjami jednego genu. Gen wybierany do analiz tego typu powinien zawierać sekwencje powtarzające się, o odpowiednim stopniu polimorfizmu [46]. Typowanie *spa* polega na sekwencjonowaniu genu *spa*, który koduje gronkowcowe białko A. Gen *spa* zawiera różne regiony funkcjonalne, w tym region wiążący Fc czy region X. Polimorficzny region X genu *spa* jest zbudowany z różnej liczby powtarzających się fragmentów o długości 24 pz. Różnice między analizowanymi sekwencjami pojawiają się po wystąpieniu mutacji punktowych, delecji czy duplikacji nukleotydów [27, 49]. Sekwencje powtarzające się różnią się między sobą przynajmniej 1 nukleotydem, a zmienna część regionu X może zawierać 2-16 powtórzeń [46]. Międzynarodowa baza danych Ridom Staph Type umożliwia porównanie uzyskanych w analizie typów *spa S. aureus*. Oprogramowanie wykrywa również liczbę powtarzających się sekwencji i określa typ *spa* badanego izolatu. Zauważono także, iż typy *spa* korelują z patogennością i wirulencją drobnoustrojów [30].

Jest to metoda stosunkowo mało kosztowna w porównaniu do innych metod molekularnych, charakteryzuje się dobrą odtwarzalnością. Istnieje także wystandaryzowane nazewnictwo metody, co ułatwia porównanie wyników. A co ważne, jest także odpowiednia do badań krótkoterminowych, na skalę lokalną [46]. Główną zaletą jest prostota jej wykonania, bo sekwencjonowaniu poddawane jest tylko jedno locus. Szacuje się, że potencjał różnicujący typowania *spa* leży między metodą MLST a PFGE [27], ale należy zaznaczyć, iż w przypadku szczepów MRSA obserwuje się wystąpienie izolatów niezawierających genu *spa* [46]. Typowanie *spa* może być użyteczne nie tylko w badaniach epidemiologicznych na dużą skalę, ale także do badania epidemii szpitalnych. Typem *spa* najczęściej izolowanym w większości krajów europejskich (oprócz Polski) jest typ *spa t032*, izolowany z częstością 11%. Do równie często izolowanych typów *spa* o zasięgu światowym należą *t003*, *t002*, *t008*, których obecność zaobserwowano na terenie Polski [30].

SEKWENCJONOWANIE CAŁEGO GENOMU (WGS)

Sekwencjonowanie całego genomu może zrewolucjonizować dotychczasowe pojęcie na temat infekcji spowodowanych przez *S. aureus* [32]. Jako narzędzie badawcze, WGS dostarczyło licznych informacji na temat pochodzenia wielolekoopornych szczepów *S. aureus*, genetycznych podstaw ich wirulencji, struktury populacyjnej tego patogenu czy dróg rozpowszechniania się klonów [20]. W następnych latach, użycie WGS może umożliwić przewidywanie ewolucji mechanizmów lekooporności czy typowanie szczepów *S. aureus* z najwyższą możliwą do osiągnięcia siłą różnicującą. Takie wyniki stanowiłyby niewątpliwie solidną podstawę do opracowania skutecznych sposobów zapobiegania szerzenia się infekcji *S. aureus* czy zarządzania i kontroli już istniejących. Technika ta dostarcza maksimum informacji na temat genomu badanego szczepu, a koszty przeprowadzenia sekwencjonowania zmierzają ku średnim kosztom innych metod genotypowych. WGS mogłoby się stać uniwersalnym narzędziem w badaniach epidemiologicznych różnego rodzaju: krótkoterminowych, długoterminowych, na skalę lokalną, krajową, międzynarodową, w środowisku szpitalnym i pozaszpitalnym [32]. Aby to mogło się jednak spełnić, niezbędne jest powstanie baz danych, zautomatyzowanych, ogólnodostępnych narzędzi bioinformatycznych, opracowanie systemów wymiany i przetwarzania bardzo wielu danych i sposobów ich przechowywania oraz powszechnej akceptacji przez specjalistów i personel laboratoriów [23].

Początkowo sekwencjonowanie opierało się na zastosowaniu techniki elektroforezy kapilarnej. Było to sekwencjonowanie pierwszej generacji, zwane także sekwencjonowaniem Sangera. Cechowało się wysokimi kosztami przeprowadzenia analizy oraz długim czasem jej trwania. Wprowadzenie technik sekwencjonowania drugiej generacji, zwanych także NGS znacznie obniżyło koszty analizy i zwiększyło przepustowość metody. Obecnie dostępnych jest wiele platform do sekwencjonowania NGS: Illumina Platform (Illumina), SOLiD platform (Life Technologies), MiSeq (Illumina) czy Ion Torrent (Life Technologies) [32]. Trwają prace nad sekwencjonowaniem trzeciej generacji – TGS, które cechuje się analizą w czasie rzeczywistym. TGS umożliwia bezpośrednią obserwację działania polimerazy tworzącej nić DNA przy dużej przepustowości i większej długości uzyskiwanych odczytów. Prowadzi to do znaczącego obniżenia kosztów analizy, jednak w porównaniu do sekwencjonowania techniką Sangera i NGS, cechuje się także błędem na poziomie 5% [33]. Przykładami sekwenatorów trzeciej generacji są MinION (OxfordNanopore) czy Sequel (Pacific Biosciences), które mogą generować fragmenty dłuższe niż 200 kb [5].

ZALETY WGS

Sekwencjonowanie całego genomu (WGS) zapewnia jednoczesne uzyskanie informacji na temat obecności genów kodujących toksyny, mechanizmów oporności i relacji między izolatami [5] oraz pozwala na porównanie genomów mikroorganizmów z rozdzielczością

1 pz [33]. Metoda staje się coraz szybsza i tańsza. Już dziś za pomocą urządzeń stacjonarnych możliwe jest uzyskanie wyniku sekwencjonowania całego genomu *S. aureus* w ciągu kilku dni. Szacuje się, iż zsekwencjonowanie genomu o wielkości 3×10^6 pz kosztuje około 75 \$ (NGS), co daje 400-krotną redukcję kosztów uzyskaną w ciągu zaledwie 8 lat [32]. Dzięki rozdzielczości z jaką porównywane są izolaty oraz analizie częstości mutacji genomowych możliwe jest precyzyjne oszacowanie czasu, jaki minął od oddzielenia się badanych szczepów od ich wspólnych przodków. Są to dane niezwykle użyteczne w charakterystyce źródeł i czynników etiologicznych infekcji szpitalnych. Dane uzyskane dzięki sekwencjonowaniu rozpatrywane przez pryzmat informacji pochodzących z innych badań epidemiologicznych pozwalają na szybką detekcję nowych szczepów alarmowych [20]. Przewiduje się, że WGS będzie bardzo pomocne w badaniu mechanizmów oporności na antybiotyki. Już teraz, dzięki tej technice potwierdzono hipotezę, iż *S. aureus* może uzyskać metycylinyoporność dzięki transferowi międzygatunkowemu genu *mecA* warunkującego oporność na wszystkie antybiotyki β -laktamowe od *Staphylococcus epidermidis* oraz ustalono, że szczepy VRSA miały gen oporności na glikopeptydy – *VanA*, w wyniku horyzontalnego transferu genów od enterokoków. Stwierdzono także, że niektóre pojedyncze mutacje są związane z obniżoną wrażliwością na antybiotyki glikopeptydowe [32].

Bezpośrednie klonowanie, sekwencjonowanie i funkcjonalna analiza materiału genetycznego z wybranych nisz ekologicznych, czyli analiza metagenomiczna, pozwala na określenie interakcji między organizmami zamieszkującymi to samo środowisko. Biorąc pod uwagę, że wiele drobnoustrojów środowiskowych charakteryzuje się wytwarzaniem substancji bakteriobójczych, analiza metagenomiczna może umożliwić ich identyfikację. Przykładem może być zidentyfikowanie dwóch nowych antybiotyków działających na szczepy MRSA – faszamycyny A i B [32]. Badacze starają się również tak dopasować parametry metody i opracować odpowiednie algorytmy do analizy danych, aby dzięki informacji genetycznej uzyskanej za pomocą technik sekwencjonowania było możliwe przewidzenie fenotypowego wzoru lekowrażliwości szczepów *S. aureus*. Gordon i wsp. porównali wyniki uzyskane metodą sekwencjonowania, konwencjonalną i fenotypową określania profilu oporności *S. aureus* i ustalono zgodność na poziomie 87% [12]. Podobną zgodność uzyskano w innych badaniach [5, 20]. WGS może także wyprzeć niektóre inne metody molekularne typowania drobnoustrojów. Przykładowo, MLST może zostać zasymulowane na podstawie danych uzyskanych w sekwencjonowaniu [20]. Strauß i wsp. opracowali metodę detekcji *in silico* 182 gronkowcowych genów na podstawie danych uzyskanych metodą sekwencjonowania i ocenili zgodność wyników uzyskanych tą techniką oraz za pomocą mikromacierzy na 96,8% [48]. Należy jednak zaznaczyć, że z powodu obecności regionów powtarzających się i dużej różnorodności, nie wszystkie geny mogą zostać zaklasyfikowane do

wariantów allelicznych bazując na danych z sekwencjonowania. W tej grupie genów znajdują się m.in. te kodujące gronkowcowe białka powierzchniowe, tj. *coa*; *cna*, kodujący białko wiążące kolagen; *clfA*, *clfB*; *fnbA*, *fnbB*, kodujące białko A/B wiążące fibronektynę, które znacznie wpływają na interakcje między bakterią a jej gospodarzem [48].

WADY WGS

Aby w przyszłości WGS mogło się stać nie tylko złożonym narzędziem badawczym, ale także rutynową techniką diagnostyczną konieczne jest rozwiązanie kilku przeszkód w dalszym rozwoju tej techniki [32]. Do uzyskania sekwencji całego genomu niezbędne jest zastosowanie odpowiednich narzędzi informatycznych, które są odpowiedzialne za skompletowanie uzyskanych danych. Przed sekwencjonowaniem bowiem, genom jest cięty na mniejsze fragmenty, a wynika to z ograniczenia sekwencjatorów pod względem długości analizowanych sekwencji - do 1000 pz [5]. Usprawnienie metody musi polegać na uzyskiwaniu dłuższych fragmentów i częstszego ich pokrycia [32, 33]. Zastosowanie urządzeń sekwencjonujących o dużej przepustowości wymaga użycia złożonych procedur przygotowania próbki, dużej liczby cykli skanowania, płukania i bazowaniu na reakcji PCR, co wiąże się z długim czasem badania. Uzyskane odczyty są stosunkowo krótkie, a to utrudnia ich analizę; uzyskuje się 80-90 % informacji genetycznej zawartej w całym genomie [33].

Nie zawsze dane uzyskane w sekwencjonowaniu mogą być wykorzystane w praktyce klinicznej. Przykładem jest obecność w zsekwencjonowanym materiale genetycznym *S. aureus* operonu *lukSF-PV*, która nie musi korelować z produkcją leukocydyny Panton-Valentin (PV) i nie oznacza, że badany izolat wywoła agresywną infekcję [20]. Aby uniknąć możliwości kontaminacji krzyżowej w badaniach nad jednym ogniskiem infekcji, standaryzacja metod pobierania próbek, hodowli drobnoustrojów i analizy materiału genetycznego powinna zostać wykonana. Trwają także prace nad zapewnieniem odpowiednich technik technologii informacyjnej, które ułatwią przechowywanie ogromnych ilości danych, a także umożliwią ich wymianę [32]. Przykładowo, dane uzyskane z sekwencjonowania genomu jednego izolatu *S. aureus* mają objętość około 1 GB [33].

PODSUMOWANIE

Omawiane metody porównano pod kątem potencjału dyskryminującego, czasu wykonania, powtarzalności międzylaboratoryjnej, łatwości zastosowania i interpretacji wyników oraz kosztów analizy (tabela 2). Ze względu na wysoki potencjał dyskryminujący i wysoki wskaźnik konkordancji wyników, najczęściej stosowanymi metodami w badaniach nad epidemiologią *S. aureus* są PFGE, typowanie genu *spa* oraz technika MLST. Obecnie obserwuje się także wzrost popularności sekwencjonowania całego genomu badanych izolatów,

Tabela 2. Porównanie metod genotypowania *Staphylococcus aureus*

Metoda	Łatwość zastosowania	Łatwość interpretacji wyników	Powtarzalność międzylaboratoryjna	Czas wykonania [dni]	Potencjał dyskryminujący	Koszt
MLVA	średnia	średnia	duża	1	duży/bardzo duży	mały/średni
RAPD	łatwa	średnia	mała	1	duży	mały
AFLP	średnia	średnia	duża	1-2	duży	średni
RFLP	łatwa	łatwa	duża	1	średni	mały
PFGE	średnia	średnia	średnia	3-4	duży/bardzo duży	średni/duży
Typowanie spa	średnia	średnia	duża	1-2	duży	średni/duży
MLST	średnia	średnia	duża	1-2	duży	duży
WGS	średnia/trudna	trudna	duża	1-2	bardzo duży	duży

Według [2, 6, 17, 18, 27, 28, 42].

ale koszty analizy, jak i dostępność aparatury ogranicza możliwości jej zastosowania. Warto także zaznaczyć, że jednym z głównych parametrów metod genotypowych branych pod uwagę w szeroko zakrojonych badaniach epidemiologicznych *S. aureus* jest powtarzalność międzylaboratoryjna wyników oraz istnienie międzynarodowych baz danych.

Dobór odpowiednich metod typowania wielolekoopornych szczepów *S. aureus* ma nadrzędne znaczenie w badaniach nad ich rozprzestrzenianiem się w środowisku szpitalnym, jak i pozaszpitalnym, określaniu relacji filogenetycznych czy opracowaniu programów prewencji i kontroli zakażeń o etiologii gronkowcowej. Metody fenotypowe mają niższe wskaźniki konkordancji i siły różnicującej niż techniki genotypowania. Za ich samodzielnym użyciem nie jest możliwe jednoznaczne

potwierdzenie zaistnienia epidemii. Wyniki uzyskane na podstawie analizy cech fenotypowych są jednak cennym źródłem informacji, które mogą być użyteczne we wstępnym dochodzeniu epidemiologicznym *S. aureus*. Metody polegające na analizie materiału genetycznego badanych szczepów mają wysoki potencjał różnicujący i m.in. z tego powodu stały się technikami stosowanymi w diagnostyce epidemiologicznej. Mimo zalet, metody biologii molekularnej mają także liczne mankamenty, a to nie pozwala na wyłonienie jednej, która mogłaby się cechować uniwersalnością i byłaby odpowiednia dla wszystkich typów badań epidemiologicznych dotyczących *S. aureus*. Największą nadzieję pokłada się więc w metodach opartych na technice sekwencjonowania DNA bakteryjnego, gdyż obserwuje się tendencje spadkową kosztów ich wykonania.

PIŚMIENNICTWO

- [1] Alfizah H., Norazah A., Nordiah A.J., Lim V.K.: DNA fingerprinting of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) in a teaching hospital in Malaysia. *Med. J. Malaysia*, 2002; 57: 319-328
- [2] Bruisten S.M., Schouls L.: Molecular typing and clustering analysis as a tool for epidemiology of infectious diseases. W: *Modern infectious disease epidemiology*, red.: A. Kramer, M. Kretzschmar, K. Krickeberg, Springer, New York 2009, 117-141
- [3] Cheung A.L., Bayer A.S., Peter J., Ward J.I.: Surface proteins of *Staphylococcus aureus*. *Rev. Infect. Dis.*, 1988; 10: S351-S355
- [4] Cookson B.D., Robinson D.A., Monk A.B., Murchan S., Deplano A., de Ryck R., Struelens M.J., Scheel C., Fussing V., Salmenlinna S., Vuopio-Varkila J., Cuny C., Witte W., Tassios P.T., Legakis N.J. i wsp.: Evaluation of molecular typing methods in characterizing a European collection of epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains: the HARMONY collection. *J. Clin. Microbiol.*, 2007; 45: 1830-1837
- [5] Deurenberg R.H., Bathoorn E., Chlebowicz M.A., Couto N., Ferdous M., García-Cobos S., Kooistra-Smid A.M., Raangs E.C., Rosema S., Veloo A.C., Zhou K., Friedrich A.W., Rossen J.W.: Application of next generation sequencing in clinical microbiology and infection prevention. *J. Biotech.*, 2017; 243: 16-24
- [6] Devriese L.A.: A simplified system for biotyping *Staphylococcus aureus* strains isolated from animal species. *J. Appl. Microbiol.*, 1984; 56: 215-220
- [7] Doškař J., Pantůček R., Růžičková V., Sedláček I.: Molecular diagnostics of *Staphylococcus aureus*. W: *Detection of bacteria, viruses, parasites and fungi. Bioterrorism prevention*, red. M.V. Magni, Springer, Dordrecht 2010, 139-184
- [8] Dukic V.M., Lauderdale D.S., Wilder J., Daum R.S., David M.Z.: Epidemics of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the United States: a meta-analysis. *PLoS One*, 2013; 8: e52722
- [9] Easy Genotyping PCR-RFLP – genotyping of *Staphylococcus aureus* strains by PCR-RFLP. http://www.dnagdansk.com/media/Products/edukit_easygenotyping_RFLP_instructor_web_1.pdf (12.06.2018)
- [10] Elbir H., Robert C., Nguyen T.T., Gimenez G., El Sanousi S.M. Flock J.I., Raoult D., Drancourt M.: *Staphylococcus aureus* subsp. *anaerobius* strain ST1464 genome sequence. *Stand. Genomic Sci.*, 2013; 9: 1-13
- [11] Faria N.A., Carrico J.A., Oliveira D.C., Ramirez M., de Lencastre H.: Analysis of typing methods for epidemiological surveillance of both methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* strains. *J. Clin. Microbiol.*, 2008; 46: 136-144

- [12] Gordon N.C., Price J.R., Cole K., Everitt R., Morgan M., Finney J., Kearns A.M., Pichon B., Young B., Wilson D.J., Llewelyn M.J., Paul J., Peto T.E., Crook D.W., Walker A.S. i wsp.: Prediction of *Staphylococcus aureus* antimicrobial resistance by whole-genome sequencing. *J. Clin. Microbiol.*, 2014; 52: 1182-1191
- [13] Hookey J.V., Richardson J.F., Cookson B.D.: Molecular typing of *Staphylococcus aureus* based on PCR restriction fragment length polymorphism and DNA sequence analysis of the coagulase gene. *J. Clin. Microbiol.*, 1998; 36: 1083-1089
- [14] Hunter P.R.: Reproducibility and indices of discriminatory power of microbial typing methods. *J. Clin. Microbiol.*, 1990; 28: 1903-1905
- [15] Jiang X., Liu Y., Liu Q., Jing W., Qin K., Sui G.: Rapid capture and analysis of airborne *Staphylococcus aureus* in the hospital using a microfluidic chip. *Micromachines*, 2016; 7: 169
- [16] Kasela M., Malm A.: Overview of phenotypic methods used for differentiation of *Staphylococcus aureus*. *Curr. Issues Pharm. Med. Sci.*, 2018; 31: 117-121
- [17] Kim C., Mwangi M., Chung M., Milheirão C., de Lencastre H., Tomasz A.: The mechanism of heterogeneous beta-lactam resistance in MRSA: key role of the stringent stress response. *PLoS One*, 2013; 8: e82814
- [18] Kondak K.: Molekularne metody diagnostyki mikrobiologicznej. *Diagn. Lab.*, 2009; 45: 325-331
- [19] Krawczyk B.: Diagnostyka molekularna w zakażeniach szpitalnych. *Post. Mikrobiol.*, 2007; 46: 367-378
- [20] Kwong J.C., McCallum N., Sintchenko V., Howden B.P.: Whole genome sequencing in clinical and public health microbiology. *Pathology*, 2015; 47: 199-210
- [21] Lee B.Y., Singh A., David M.Z., Bartsch S.M., Slayton R.B., Huang S.S., Zimmer S.M., Potter M.A., Macal C.M., Lauderdale D.S., Miller L.G., Daum R.S.: The economic burden of community-associated methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA). *Clin. Microbiol. Infect.*, 2013; 19: 528-536
- [22] Łuczak-Kadubowska A., Sulikowska A., Empel J., Piasecka A., Orzykowska M., Kozinska A., Hryniewicz W.: Countrywide molecular survey of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains in Poland. *J. Clin. Microbiol.*, 2008; 46: 2930-2937
- [23] Maiden M.C., Jansen Van Rensburg M.J., Bray J.E., Earle S.G., Ford S.A., Jolley K.A., McCarthy N.D.: MLST revisited: the gene-by-gene approach to bacterial genomics. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2013; 11: 728-736
- [24] Manukumar H.M., Umeha S.: MALDI-TOF-MS based identification and molecular characterization of food associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Sci. Rep.*, 2017; 7: 1414
- [25] Marlowe E.M., Bankowski M.J.: Conventional and molecular methods for the detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.*, 2011; 49: S53-S56
- [26] Mobasherizadeh S., Shojaei H., Havaei S.A., Mostafavizadeh K., Davoodabadi F., Khorvash F., Ataei B., Daei-Naser A.: Application of the random amplified polymorphic DNA (RAPD) fingerprinting to analyze genetic variation in community associated-methicillin resistant *Staphylococcus Aureus* (CA-MRSA) isolates in Iran. *Glob. J. Health Sci.*, 2016; 8: 185-191
- [27] Ohadian Moghadam S., Pourmand M.R., Douraghi M., Sabzi S., Ghaffari P.: Utilization of PFGE as a powerful discriminative tool for the investigation of genetic diversity among MRSA strains. *Iran. J. Public Health*, 2017; 46: 351-356
- [28] Okuma K., Iwakawa K., Turnidge J.D., Grubb W.B., Bell J.M., O'Brien F.G., Coombs G.W., Pearman J.W., Tenover F.C., Kapi M., Tiensasitorn C., Ito T., Hiramatsu K.: Dissemination of new methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in the community. *J. Clin. Microbiol.*, 2002; 40: 4289-4294
- [29] Onasanya A., Mignouna H.D., Thottappilly, G.: Genetic fingerprinting and phylogenetic diversity of *Staphylococcus aureus* isolates from Nigeria. *Afr. J. Biotechnol.*, 2003; 2: 246-250
- [30] Pobiega M., Wójkowska-Mach J., Heczko P.B.: Typowanie *Staphylococcus aureus* w celu określenia dróg szerzenia się lekoopornych szczepów w środowisku szpitalnym i pozaszpitalnym. *Przegl. Epidemiol.*, 2013; 67: 539-542
- [31] Pourcel C., Hormigos K., Onteniente L., Sakwinska O., Deurenberg R.H., Vergnaud G.: Improved MLVA assay for *Staphylococcus aureus* providing a highly informative genotyping technique together with strong phylogenetic value. *J. Clin. Microbiol.*, 2009; 47: 3121-3128
- [32] Price J., Gordon N.C., Crook D., Llewelyn M., Paul J.: The usefulness of whole genome sequencing in the management of *Staphylococcus aureus* infections. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2013; 19: 784-789
- [33] Price J.R., Didelot X., Crook D.W., Llewelyn M.J., Paul J.: Whole genome sequencing in the prevention and control of *Staphylococcus aureus* infection. *J. Hosp. Infect.*, 2013; 83: 14-21
- [34] Rabello R.F., Moreira B.M., Lopes R.M., Teixeira L.M., Riley L.W., Castro A.C.: Multilocus sequence typing of *Staphylococcus aureus* isolates recovered from cows with mastitis in Brazilian dairy herds. *J. Med. Microbiol.*, 2007; 56: 1505-1511
- [35] Rasschaert G., Vanderhaeghen W., Dewaele I., Janež N., Huijsdens X., Butaye P., Heyndrickx M.: Comparison of fingerprinting methods for typing methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* sequence type 398. *J. Clin. Microbiol.*, 2009; 47: 3313-3322
- [36] Rodriguez M., Hogan P.G., Satola S.W., Crispell E., Wylie T., Gao H., Sodergren E., Weinstock G.M., Burnham C.A., Fritz S.A.: Discriminatory indices of typing methods for epidemiologic analysis of contemporary *staphylococcus aureus* strains. *Medicine*, 2015; 94: 1534
- [37] Rolo J., Miragaia M., Turlej-Rogacka A., Empel J., Bouchami O., Faria N.A., Tavares A., Hryniewicz W., Fluit A.C., de Lencastre H., CONCORD Working Group: High genetic diversity among community-associated *Staphylococcus aureus* in Europe: results from a multicenter study. *PLoS One*, 2012; 7: e34768
- [38] Sabat A., Krzyszton-Russjan J., Strzalka W., Filipek R., Kosowska K., Hryniewicz W., Travis J., Potempa J.: New method for typing *Staphylococcus aureus* strains: multiple-locus variable-number tandem repeat analysis of polymorphism and genetic relationships of clinical isolates. *J. Clin. Microbiol.*, 2003; 41: 1801-1804
- [39] Sabat A., Malachowa N., Miedzobrodzki J., Hryniewicz W.: Comparison of PCR-based methods for typing *Staphylococcus aureus* isolates. *J. Clin. Microbiol.*, 2006; 44: 3804-3807
- [40] Saruta K., Hoshina S., Machida K.: Genetic identification of *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction using single-base-pair mismatch in 16S ribosomal RNA gene. *Microbiol. Immunol.*, 1995; 39: 839-844
- [41] Savelkoul P.H., Aarts H.J., De Haas J., Dijkshoorn L., Duim B., Otsen M., Rademaker J.L., Schouls L., Lenstra J.A.: Amplified-fragment length polymorphism analysis: the state of an art. *J. Clin. Microbiol.*, 1999; 37: 3083-3091
- [42] Shahkarami F., Rashki A., Rashki Ghalehnoo Z.R.: Microbial susceptibility and plasmid profiles of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and methicillin-susceptible *S. aureus*. *Jundishapur J. Microbiol.*, 2014; 7: e16984
- [43] Shakeri F., Mansourian A.R., Ghaeimi E.A.: *Staphylococcus aureus* protein A gene typing by PCR-RFLP. *Afr. J. Microbiol. Res.*, 2013; 7: 3448-3452
- [44] Sobral D., Schwarz S., Bergonier D., Brisabois A., Feßler A.T., Gilbert F.B., Kadlec K., Lebeau B., Loisy-Hamon F., Treilles M., Pourcel C., Vergnaud G.: High throughput multiple locus variable number of tandem repeat analysis (MLVA) of *Staphylococcus aureus* from human, animal and food sources. *PLoS One*, 2012; 7: e33967
- [45] Sridhar R.: Typing methods. <http://microrao.com/micronotes/typing.pdf> (12.06.2018)
- [46] Stark L.: *Staphylococcus aureus*: aspects of pathogenesis and molecular epidemiology. PhD Thesis, Linköping University Electronic Press, Linköping 2013

- [47] Stojowska K.: Opracowanie nowych metod typowania genetycznego bakterii opartych o ligację adaptorów oligonukleotydowych do fragmentów restrykcyjnych genomowego DNA i technikę PCR, zastosowanie i ocena ich przydatności w badaniach epidemiologicznych. <http://pbc.gda.pl/Content/24012> (12.06.2018)
- [48] Strauß L., Ruffing U., Abdulla S., Alabi A., Akulenko R., Garrine M., Germann A., Grobusch M.P., Helms V., Herrmann M., Kazimoto T., Kern W., Mandomando I., Peters G., Schaumburg F. i wsp.: Detecting *Staphylococcus aureus* virulence and resistance genes: a comparison of whole-genome sequencing and DNA microarray technology. *J. Clin. Microbiol.*, 2016; 54: 1008-1016
- [49] Szabó J.: Molecular methods in epidemiology of Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): advantages, disadvantages of different techniques. *J. Med. Microb. Diagn.*, 2014; 3: 1000147
- [50] Szaluś-Jordanow O., Chrobak D., Pyrgiel M., Lutyńska A., Kaba J., Czopowicz M., Witkowski L., Kizerwetter-Świda M., Binek M., Frymus T.: PFGE and AFLP genotyping of *Staphylococcus aureus* subsp. *anaerobius* isolated from goats with Morel's disease. *Arch. Microbiol.*, 2013; 195: 37-41
- [51] Ugbogu O.C., Akinsade A.K., Nwokocha K.O., Ahuama O.C.: Plasmid profile of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolates from university students. *Nig. J. Microbiol.*, 2011; 25: 2363-2368
- [52] Vainio A.: Molecular methods for the epidemiological analysis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and *Streptococcus pneumoniae*. National Institute for Health and Welfare (THL), Tampere, Finland 2012
- [53] Van Belkum A.: Hidden *Staphylococcus aureus* carriage: overrated or underappreciated? *MBio*, 2016; 7: e00079-16
- [54] Van Leeuwen W.B., Jay C., Snijders S., Durin N., Lacroix B., Verbrugh H.A., Enright M.C., Troesch A., van Belkum A.: Multilocus sequence typing of *Staphylococcus aureus* with DNA array technology. *J. Clin. Microbiol.*, 2003; 41: 3323-3326
- [55] Witt R.T., van Belkum A., van Leeuwen W.B.: Molecular diagnostics and genotyping of MRSA: an update. *Expert. Rev. Mol. Diagn.*, 2010; 10: 375-380

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.