

Streszczenie rozprawy doktorskiej pt.

„Bioróżnorodność i potencjał toksynotwórczy koagulazo-ujemnych gronkowców (CNS) wyizolowanych z mleka”

Autor: mgr inż. **Izabela Helak**

Promotor: **prof. dr hab. inż. Elżbieta Grażyna Daczkowska-Kozon**

Liczący aktualnie 52 gatunki i 28 podgatunków rodzaj *Staphylococcus*, to w przewodzie koagulazo-ujemne gronkowce (CNS), zaliczane ciągle do oportunistycznych patogenów.

W ukierunkowanej na gronkowce analizie żywności, wymóg oznaczania dotyczy tylko koagulazo – dodatnich gronkowców (CPS), w tym głównie *S. aureus*, co sprawia, że stosunkowo mało wiadomo na temat udziału CNS w gronkowcowych zatruciach pokarmowych. Sama obecność gronkowców w żywności nie oznacza jeszcze zagrożenia dla zdrowia konsumenta. Takie zagrożenie stwarzać może dopiero obecność potencjalnie enterotoksycznych szczepów w zanieczyszczeniu żywności.

Przy częstym sąsiedztwie i przewodzie liczebnej CNS nad CPS (w tym *S. aureus*) w zanieczyszczeniu żywności oraz możliwości horyzontalnego transferu genów (HGT), w tym genów enterotoksyn, udział toksynotwórczych CNS w zatruciach pokarmowych może być znacznie większy niż się powszechnie sądzi.

Według szacunkowych danych (USA), liczba przypadków gronkowcowych zatruc pokarmowych (SFP) rocznie sięga 240 000, z czego 1000 wymaga hospitalizacji, a 6 kończy się śmiercią.

Przy stosunkowo licznych danych, potwierdzających chorobotwórczość klinicznych szczepów CNS, wiedza na temat potencjału enterotoksycznego CNS w żywności jest ciągle wrywkowa i niejednoznaczna. Powodem niejasności mogą być m.in.: różna liczba badanych szczepów, często o różnej przynależności gatunkowej, różnorodność środowisk ich pozyskiwania, zastosowana metodyka badań czy liczba i rodzaj oznaczanych enterotoksyn.

Celem pracy było zatem kompleksowe podejście do oceny zagrożenia związanego z obecnością przedstawicieli grupy CNS w zanieczyszczeniu żywności, tu surowego mleka krowiego z regionu Pomorza Zachodniego, obejmujące zróżnicowanie fenotypowe szczepów oraz ich potencjał enterotoksyczny, z określeniem przynależności gatunkowej koagulazo-ujemnych gronkowców uznanych za potencjalnie enterotoksyczne.

Przyjęta hipoteza badawcza pracy zakładała, że szczepy CNS stanowiące zanieczyszczenie surowego mleka badanego regionu, są nośnikami genów enterotoksyn i cechuje je duże zróżnicowanie fenotypowe.

Przedmiotem badań były szczepy gronkowców, wyizolowane z surowego mleka krowiego z regionu Pomorza Zachodniego w okresie luty 2011 r. - lipiec 2011 r., zdeponowane w kolekcji szczepów Katedry Mikrobiologii i Biotechnologii Stosowanej ZUT w Szczecinie.

Wśród 299. wyizolowanych z mleka badanego regionu i przebadanych szczepów gronkowców przeważały liczebnie CNS (163 szczepy). Żaden z koagulazo-ujemnych szczepów nie był atypowym *S. aureus*.

Szczepy CNS z mleka cechowała duża bioróżnorodność. Na podstawie 7. podstawowych cech morfometryczno – biochemicznych, w grupie 163. szczepów wyróżniono aż 62 profile fenotypowe.

Potencjał enterotoksyczny, badanych szczepów CNS, oceniano na podstawie obecności, wszystkich dotąd poznanych, posiadających startery, genów (18/25) warunkujących zdolność do produkcji enterotoksyn. Oznaczanie genów enterotoksyn prowadzono techniką multiplex/duplex PCR z wykorzystaniem, standardowych dla *S. aureus*, par starterów.

Wstępnie, na podstawie obecności amplikonów zbliżonych lub odpowiadających wielkością genom enterotoksyn O, G i D, za potencjalnie enterotoksyczne uznano 32/163 badane szczepy CNS. Analiza przeprowadzona metodą single PCR, potwierdziła obecność genów enterotoksyn jedynie w przypadku 8. z 32. CNS. Wszystkie 8 szczepów było nośnikami genu *seg*, warunkującego produkcję „nowej” enterotoksyny G i należały do gatunku *S. haemolyticus*. Analiza produktu reakcji PCR (gen *seg*) wykazała 99.% zgodność sekwencji nukleotydowej genu enterotoksyny G szczepów CNS z referencyjną dla genu tej enterotoksyny u *S. aureus*.

Nowatorskim elementem pracy było wykazanie ograniczonej przydatności metody multiplex/duplex PCR w ocenie potencjału enterotoksycznego szczepów CNS oraz wskazanie przyczyn obecności „fałszywie dodatnich” produktów w obrazie elektroforetycznym. „Fałszywie dodatnie” produkty reakcji, w przypadku 24. pozostałych szczepów, były wynikiem przyłączania się, do DNA badanych CNS, nici z 2. różnych par starterów: *selm/see* (17/32 szczepów) i *sed/selk* (7/32 szczepów).

Przynależność gatunkową potencjalnie enterotoksycznych szczepów CNS z mleka określano metodą MALDI-TOF MS oraz VITEK 2. Materiał komórkowy do identyfikacji pobierano z 2. pożywek wzrostowych: BHIA i CA.

Wynik identyfikacji zależał od podłoża wzrostowego; wyższą prawidłowość identyfikacji do gatunku uzyskano dla materiału komórkowego izolowanego z podłoża BHIA. Na 32 poddane identyfikacji szczepy CNS prawidłowo do gatunku, zaklasyfikowano 12 (wszystkie zidentyfikowano jako *S. epidermidis*). Dwanaście, z 20. pozostałych szczepów, uzyskało jedynie wiarygodną identyfikację do rodzaju, a pozostałe 8 nie zostało zidentyfikowanych. Identyfikacja m. VITEK 2 8. niezidentyfikowanych szczepów, zaklasyfikowała 5. z nich jako: *S. xylosum* (1), *S. chromogenes* (1), *S. haemolyticus* (2), *S. schleiferi* (1). Trzy z 32. szczepów CNS nie zostało zidentyfikowane żadną z zastosowanych metod.

Wykazano, że identyfikacja oparta zarówno na profilu białkowym (MALDI-TOF MS) jak i cechach biochemicznych (VITEK 2), nie gwarantuje określenia przynależności, szczepów z grupy CNS, do gatunku. Atypowość cech i jak wykazano w pracy, ograniczona trafność identyfikacji szczepów, bez względu na zastosowaną metodę, rodzi pytanie co do celowości takiej identyfikacji w przypadku szczepów z grupy CNS.

By wydzielić szczepy CNS z potencjałem enterotoksycznym z liczniejszej grupy niechorobotwórczych CNS, w pracy, po raz pierwszy, zastosowano metodę taksonomii numerycznej *k*-medoidów. W metodzie tej szczepy łączone były w grupy na podstawie macierzy odległości podobieństwa jakościowych cech fenotypowych, uwzględnianych w rutynowej, ukierunkowanej na gronkowce, analizie żywności. Przy grupowaniu szczepów, opartym na 7. standardowych fenotypowych cechach, 163, wyizolowane z surowego mleka, CNS utworzyły 3 odrębne klasy. W składzie jednej, znalazły się wszystkie szczepy zawierające w genomie gen *seg*, kodujący enterotoksynę G.

10.06.2019 r.

Isabella Helak