

Ewa Szczuka^{1*}, Nicoletta Makowska¹, Adam Kaznowski¹

¹Zakład Mikrobiologii, Instytut Biologii Eksperymentalnej, Wydział Biologii,
Uniwersytet im. A. Mickiewicza w Poznaniu, ul. Umultowska 89, 61-614 Poznań

Wpłynęło w maju 2012 r.

1. Wprowadzenie. 2.1. Różnicowanie gatunków na podstawie sekwencji 16S rDNA. 2.2. Wykorzystanie polimorfizmu międzygenowego 16S rRNA i 23S rRNA do identyfikacji gronkowców. 2.3. Identyfikacja gronkowców na podstawie sekwencji oraz analizy restrykcyjnej genu *gap*. 2.4. Sekwencja genu *hsp60* jako marker genetyczny stosowany w klasyfikacji i identyfikacji gronkowców. 2.5. Polimorfizm genu *dnaJ* wykorzystany w identyfikacji *Staphylococcus* spp. 2.6. Różnicowanie gatunków gronkowców na podstawie sekwencji genu *tuf*. 2.7. Diagnostyka gatunków gronkowców w oparciu o polimorfizm genu *sodA*. 2.8. Identyfikacja na podstawie sekwencji genu *ropB*. 3. Zastosowanie reakcji PCR w czasie rzeczywistym w diagnostyce gronkowców. 4. Wykorzystanie spektrometrii mas w identyfikacji gronkowców. 5. Podsumowanie

Molecular methods for the identification of bacteria from the genus *Staphylococcus*

Abstract: Staphylococci are increasingly recognized as etiological agent of many opportunistic human and animal infections, indicating the need for rapid and accurate identification of these bacteria. In recent years, a significant progress in the identification and phylogenetic studies of *Staphylococcus* species has been made. In this paper we describe several molecular methods used in taxonomy and identification of staphylococci. The analysis of 16S rRNA gene, *gap* gene (coding for glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), *hsp60* gene (encoding heat shock protein Hsp60), *dnaJ* gene (encoding heat shock protein Hsp40), *tuf* gene (encoding elongation factor Tu), *sodA* gene (encoding superoxide dismutase), *ropB* gene (encoding the beta subunit of RNA polymerase) has been used as tool for the identification of *Staphylococcus* isolates. Besides the sequence analysis, the PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) analysis of core genes (16S rRNA, *gap*, *hsp60*, *dnaJ*, *tuf*) has been described. Attention is also paid to new molecular methods such as real-time PCR and mass spectrometry.

1. Introduction. 2.1. Differentiation of staphylococcal species based on 16S rRNA gene sequence. 2.2. Use of the polymorphism of the 16S-23S rRNA spacer for staphylococci identification. 2.3. Identification of staphylococci using the sequence and restriction fragment length polymorphism analysis of *gap* gene. 2.4. The sequence of the *hsp60* gene as a marker for classification and identification of staphylococci. 2.5. Use of polymorphism of *dnaJ* gene for the identification of *Staphylococcus* spp. 2.6. Differentiation of staphylococcal species based on *tuf* gene sequence. 2.7. Use of the polymorphism of *sodA* gene in diagnostics of staphylococcal species. 2.8. Identification based on *ropB* gene sequence. 3. Application of real-time PCR in diagnostics of staphylococci. 4. Application of mass spectrometry in the identification of staphylococcal isolates. 5. Summary

Słowa kluczowe: *Staphylococcus*, identyfikacja, genetyczne różnicowanie

Key words: *Staphylococcus*, identification, genetic diversity

1. Wstęp

Bakterie z rodzaju *Staphylococcus* powszechnie występują w środowisku naturalnym. Wiele gatunków gronkowców stanowi naturalny składnik flory bakteryjnej skóry i błon śluzowych człowieka. Szczepy gronkowców są również izolowane z produktów pochodzenia zwierzęcego oraz gleby, kurzu i powietrza [15, 22, 39]. Obecnie do rodzaju *Staphylococcus* zalicza się 47 gatunki, przy czym w obrębie 10 gatunków wyodrębniono podgatunki [1, 7, 15, 17, 30, 32, 36, 45, 47] (Tab. I). Istniejący historyczny podział na gronkowce koagulazo-dodatnie i koagulazo-ujemne oparty jest na zdolności lub braku do wytwarzania zewnątrzkomórkowego białka stymulującego proces krzepnięcia plazmy. Do gronkowców koagulazo-dodatnich należą następu-

jące gatunki: *S. aureus*, *S. intermedius*, *S. schleiferi* subsp. *coagulans*, *S. pseudintermedius*, *S. lutrae*, *S. delphini* oraz niektóre szczepy zaliczane do gatunku *S. hyicus* [22, 34, 49]. Największe znaczenie kliniczne ma gronkowiec złocisty (*S. aureus*), który odpowiedzialny jest za wiele różnych zakażeń człowieka.

Gronkowce koagulazo-ujemnych wywołują zakażenia głównie u osób z obniżoną odpornością oraz ludzi, u których w leczeniu zastosowano różnego rodzaju cewniki, protezy oraz implanty ortopedyczne [28, 37]. Za główny czynnik wirulencji tej grupy bakterii uważa się zdolność tworzenia złożonych struktur biofilmowych na powierzchniach abiotycznych jak również na powierzchni uszkodzonej tkanki [8, 15]. Wśród gronkowców koagulazo-ujemnych wywołujących zakażenia u ludzi gatunkiem dominującym jest *S. epidermidis*.

* Autor korespondencyjny: Zakład Mikrobiologii, Instytut Biologii Eksperymentalnej, Wydział Biologii, Uniwersytet im. A. Mickiewicza w Poznaniu, ul. Umultowska 89, 61-614 Poznań; tel. 61 829 59 36; e-mail: ewasz@amu.edu.pl

Tabela I
 Gatunki i podgatunki wyróżnione w rodzaju *Staphylococcus* sp.
 [1, 7, 15, 17, 30, 32, 36, 45, 47]

<i>S. agnetis</i>	<i>S. lentus</i>
<i>S. aureus</i> subsp. <i>anaerobius</i>	<i>S. lugdunensis</i>
<i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	<i>S. lutrae</i>
<i>S. arlettae</i>	<i>S. massiliensis</i>
<i>S. auricularis</i>	<i>S. microti</i>
<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	<i>S. muscae</i>
<i>S. capitis</i> subsp. <i>urealyticus</i>	<i>S. nepalensis</i>
<i>S. caprae</i>	<i>S. pasteurii</i>
<i>S. carnosus</i> subsp. <i>carnosus</i>	<i>S. pettenkoferi</i>
<i>S. carnosus</i> subsp. <i>utilis</i>	<i>S. petrasii</i>
<i>S. chromogenes</i>	<i>S. piscifermentans</i>
<i>S. cohnii</i> subsp. <i>cohnii</i>	<i>S. pseudintermedius</i>
<i>S. cohnii</i> subsp. <i>urealyticus</i>	<i>S. rostri</i>
<i>S. condimentii</i>	<i>S. saccharolyticus</i>
<i>S. delphini</i>	<i>S. saprophyticus</i> subsp. <i>bovis</i>
<i>S. devriesei</i>	<i>S. saprophyticus</i> subsp. <i>saprophyticus</i>
<i>S. epidermidis</i>	<i>S. schleiferi</i> subsp. <i>schleiferi</i>
<i>S. equorum</i> subsp. <i>equorum</i>	<i>S. schleiferi</i> subsp. <i>coagulans</i>
<i>S. equorum</i> subsp. <i>linens</i>	<i>S. sciuri</i> subsp. <i>carnaticus</i>
<i>S. felis</i>	<i>S. sciuri</i> subsp. <i>rodentium</i>
<i>S. fleurettii</i>	<i>S. sciuri</i> subsp. <i>sciuri</i>
<i>S. gallinarum</i>	<i>S. simiae</i>
<i>S. haemolyticus</i>	<i>S. simulans</i>
<i>S. hominis</i> subsp. <i>hominis</i>	<i>S. stepanovicii</i>
<i>S. hominis</i> subsp. <i>novobiosepticus</i>	<i>S. succinus</i> subsp. <i>casei</i>
<i>S. hyicus</i>	<i>S. succinus</i> subsp. <i>succinus</i>
<i>S. intermedius</i>	<i>S. vitulinus</i>
<i>S. jettensis</i>	<i>S. warneri</i>
<i>S. kloosii</i>	<i>S. xylosum</i>

Coraz częściej obserwuje się infekcje wywołane przez szczepy *S. haemolyticus*, *S. hominis* i *S. saprophyticus*. Natomiast znacznie rzadziej czynnikiem etiologicznym infekcji człowieka są *S. warneri*, *S. simulans*, *S. capitis*, *S. lugdunensis*, *S. caprae*, *S. xylosum*, *S. sciuri*, *S. chromogenes*, *S. auricularis*, *S. schleiferi*, *S. cohnii*, *S. quorum*, *S. intermedius*, *S. pseudintermedius* [5, 12, 21, 38, 42, 43, 48–50]. Z materiałów pobranych od zwierząt izolowane są głównie *S. intermedius*, *S. sciuri* i *S. hyicus* [15, 33, 34]. Rosnący udział gronkowców koagulazo-ujemnych w zakażeniach ludzi i zwierząt stwarza konieczność prawidłowej ich identyfikacji, co z kolei umożliwi precyzyjne określenie roli poszczególnych gatunków gronkowców w chorobotwórczości. Fenotypowa identyfikacja gronkowców koagulazo-ujemnych jest długotrwała i uciążliwa. Powszechnie stosowane testy komercyjne nie odznaczają się wysoką wiarygodnością [3, 39, 53]. Na przestrzeni kilkunastu ostatnich lat zaproponowano

kilkanaście metod opartych na analizie DNA bakteryjnego, które zdaniem autorów umożliwiają identyfikację gatunków gronkowców.

2.1. Różnicowanie gatunków na postawie sekwencji 16S rDNA

Ze względu na wysoce konserwatywny charakter 16S rDNA gronkowców nie jest możliwe różnicowanie wszystkich gatunków [46]. Kwock i wsp. [26] określili, że podobieństwo sekwencji 16S rDNA szczepów reprezentujących 29 gatunków gronkowców jest bardzo wysokie i wynosi od 92 do 99%. Jednak Becker i wsp. [3] wykazali możliwość różnicowania 38 gatunków gronkowców na podstawie sekwencji końcowego regionu genu 16S rRNA o długości 464 pz, obejmującego nukleotydy od pozycji 54 do 510. Określono, że poszczególne gatunki obejmują szczepy bakteryjne z przynajmniej 98,7% podobieństwem sekwencji nukleotydowej. Wszystkie szczepy referencyjne i typowe poszczególnych gatunków gronkowców mogły być rozróżnione z wyjątkiem *S. intermedius* i *S. delphini*. Taką samą sekwencją nukleotydową miały szczepy *S. pulvereri* i *S. vitulinus*, które obecnie uważane są za jeden gatunek. Wynik analizy sekwencji wyżej wymienionego fragmentu 16S rDNA umożliwił różnicowanie podgatunków w obrębie *S. carnosus*, *S. cohnii*, *S. hominis*, *S. schleiferi* i *S. succinus*. Natomiast niemożliwe było różnicowanie podgatunków *S. aureus*, *S. capitis*, *S. equorum*, *S. saprophyticus* i *S. sciuri*.

W 2010 roku ukazała się praca przedstawiająca wyniki badań mające na celu opracowanie metody identyfikacji gronkowców w oparciu o analizę restrykcyjną fragmentu sekwencji 16S rDNA. Onni i wsp. [31] zaprojektowali startery umożliwiające amplifikację zmiennego regionu genu 16S rRNA. W wyniku reakcji PCR otrzymano produkt o wielkości 1403 pz, który następnie był podany trawieniu enzymami restrykcyjnymi: *RsaI*, *PstI* i *AluI*. Uzyskane fragmenty DNA rozdzielano elektroforetycznie w denaturującym żelu poliakrylamidowym. Onni i wsp. [31] do swych badań włączyli 9 szczepów referencyjnych oraz liczną grupę szczepów wyizolowanych z mleka owiec (tabela II).

2.2. Wykorzystanie polimorfizmu międzygenowego 16S rRNA i 23S rRNA do identyfikacji gronkowców

Couto i wsp. [6] zaproponowali wykorzystanie polimorficznych regionów pomiędzy genami kodującymi 16S rRNA i 23S rRNA (ITS, internal transcribed spacer) do identyfikacji gronkowców. Regiony ITS odznaczają się różną wielkością oraz wysokim stopniem zróżnicowania sekwencji u poszczególnych gatunków bakterii. Zalety i wady tej metody przedsta-

Tabela II

Porównanie wybranych molekularnych metod identyfikacji bakterii z rodzaju *Staphylococcus*

Metoda	Zalety	Wady
RFLP sekwencji 16S rDNA [31]	– możliwość różnicowania 9 szczepów referencyjnych: <i>S. epidermidis</i> , <i>S. chromogenes</i> , <i>S. caprae</i> , <i>S. xylosum</i> , <i>S. sciuri</i> , <i>S. simulans</i> , <i>S. warneri</i> , <i>S. capitis</i> , <i>S. hominis</i>	– brak możliwości różnicowania izolatów należących do gatunków <i>S. epidermidis</i> , <i>S. caprae</i> i <i>S. capitis</i>
analiza polimorfizmu międzygenowego 16S rRNA i 23S rRNA [6]	– unikatowe profile dla 29 typowych i referencyjnych szczepów gronkowców – możliwość różnicowania trzech podgatunków <i>S. sciuri</i>	– wysokie podobieństwo profili DNA w obrębie gronkowców należących do grupy <i>S. saprophyticus</i> obejmującej następujące gatunki: <i>S. cohnii</i> , <i>S. gallinarum</i> , <i>S. xylosum</i> , <i>S. lentus</i> , <i>S. equorum</i> , <i>S. chromogenes</i> , <i>S. saprophyticus</i> – wysokie podobieństwo wzorów DNA szczepów <i>S. schleiferi</i> i <i>S. vitulus</i> oraz <i>S. piscifermentas</i> i <i>S. carnosus</i> – brak możliwości odróżnienia podgatunków w obrębie <i>S. cohnii</i> i <i>S. schleiferi</i>
RFLP genu <i>gap</i> [27]	– możliwość identyfikacji 28 gatunków gronkowców	– i <i>S. capitis</i> przeprowadzenie analizy RFLP wymaga zastosowania trzech enzymów restrykcyjnych, <i>DdeI</i> , <i>BspHI</i> i <i>TaqI</i> .
RFLP genu <i>hsp60</i> [2]	– możliwość identyfikacji 12 szczepów typowych reprezentujących najczęściej izolowane gatunki gronkowców: <i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i> , <i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i> , <i>S. cohnii</i> subsp. <i>cohnii</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>S. haemolyticus</i> , <i>S. hominis</i> subsp. <i>hominis</i> , <i>S. lugdunensis</i> , <i>S. saprophyticus</i> , <i>S. schleiferi</i> , <i>S. simulans</i> , <i>S. xylosum</i> i <i>S. warneri</i>	– zróżnicowane profile DNA uzyskane dla szczepów <i>S. aureus</i> i <i>S. lugdunensis</i> , możliwe jest jednak określenie przynależności gatunkowej tych izolatów
RFLP genu <i>dnaI</i> [16]	– pozwala na uwidocznienie różnic pomiędzy profilami DNA 41 referencyjnych szczepów	– metoda ta umożliwia różnicowanie podgatunków w obrębie: <i>S. capitis</i> , <i>S. carnosus</i> , <i>S. cohnii</i> i <i>S. hominis</i>
RFLP genu <i>tuf</i> [24]	– możliwość identyfikacji 11 najczęściej izolowanych gatunków gronkowców: <i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>S. haemolyticus</i> , <i>S. hominis</i> , <i>S. warneri</i> , <i>S. simulans</i> , <i>S. capitis</i> , <i>S. saprophyticus</i> , <i>S. cohnii</i> , <i>S. auricularis</i> , <i>S. lugdunensis</i>	– przeprowadzenie tej analizy wymaga zastosowania czterech enzymów restrykcyjnych: <i>BstZ17I</i> , <i>MseI</i> , <i>BieI</i> i <i>HinfI</i>
Analiza sekwencyjna genu <i>sodA</i> [35]	– pozwala na różnicowanie 40 typowych szczepów gronkowców	– brak możliwości różnicowania większości podgatunków gronkowców: <i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i> i <i>S. capitis</i> subsp. <i>ureolyticus</i> , <i>S. carnosus</i> subsp. <i>carnosus</i> i <i>S. carnosus</i> subsp. <i>utilis</i> , <i>S. hominis</i> subsp. <i>hominis</i> i <i>S. hominis</i> subsp. <i>novobiosepticus</i> , <i>S. saprophyticus</i> subsp. <i>bovis</i> i <i>S. saprophyticus</i> subsp. <i>saprophyticus</i> , <i>S. schleiferi</i> subsp. <i>coagulans</i> i <i>S. schleiferi</i> subsp. <i>schleiferi</i> , <i>S. sciuri</i> subsp. <i>carnaticus</i> i <i>S. sciuri</i> subsp. <i>sciuri</i>
Analiza sekwencyjna genu <i>rpoB</i> [9]	– umożliwia różnicowanie 29 gatunków typowych szczepów gronkowców – polimorfizm sekwencji genu <i>rpoB</i> pozwala na odróżnienie gatunku <i>S. caprae</i> od <i>S. capitis</i>	

wiono w tabeli II. Przy zastosowaniu metody ITS-PCR zbadano przynależność 617 szczepów wyizolowanych od hospitalizowanych pacjentów. Zidentyfikowano 11 gatunków gronkowców (*S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. aureus*, *S. hominis*, *S. saprophyticus*, *S. warneri*, *S. simulans*, *S. lugdunensis*, *S. caprae*, *S. carnosus*, *S. cohnii*), 25 izolatów nie udało się zaklasyfikować do żadnego gatunku. Autorzy zaznaczają, że wzory DNA uzyskane dla szczepów należących do gatunków *S. aureus*, *S. caprae*, *S. haemolyticus* i *S. lugdunensis* cechowały się

wysokim polimorfizmem, pomimo tego, według wyżej wymienionych autorów możliwa jest wiarygodna diagnostyka gronkowców.

2.3. Identyfikacja gronkowców na podstawie sekwencji oraz analizy restrykcyjnej genu *gap*

Yugueros i wsp. [51, 52] zaproponowali identyfikację gatunków i podgatunków gronkowców na podstawie analizy restrykcyjnej genu *gap*. Koduje on

białko, dehydrogenazę aldehydu 3-fosfoglicerynowego. Gen *gap* jest konserwatywny, jednakże fragment o wielkości 933 pz (obejmujący nukleotydy od pozycji 22 do 956) odznacza się zmiennością, która może być wykorzystana do identyfikacji gronkowców. W wyniku trawienia enzymem *AluI* i rozdziału w żelu agarozowym uzyskano wzory składające się od 5 do 9 fragmentów DNA [51]. Przeprowadzenie analizy RFLP genu *gap* wymaga zastosowania aparatu do elektroforezy z długą drogą rozdziału elektroforetycznego oraz agaru MetaPhor, który umożliwi rozdzielenie małych fragmentów DNA. Zaobserwowano polimorfizm wzorów DNA w obrębie gatunków *S. epidermidis*, *S. hominis* i *S. simulans*. Natomiast dla 120 szczepów *S. aureus* uzyskano taki sam profil DNA. Y u g u e r o s i wsp. [52] stwierdzili możliwość identyfikacji 24 gatunków gronkowców. W 2007 roku L a y e r i wsp. wskazali na możliwość identyfikacji 28 gatunków gronkowców na podstawie analizy polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych terminalnego regionu genu *gap*, który odznacza się wysokim stopniem zmienności sekwencji (tabela II).

Analiza częściowej sekwencji genu *gap* pozwoliła na utworzenie drzewa filogenetycznego i wyłonienie czterech grup *S. hyicus/S. intermedius*, *S. haemolyticus/S. simulans*, *S. sciuri* oraz *S. aureus/S. epidermidis* [13]. Podobieństwo sekwencji szczepów zaliczanych do jednego gatunku było bardzo wysokie, np. dla szczepów gatunku *S. epidermidis* wynosiło powyżej 99%. Wykazano większy polimorfizm sekwencji genu *gap* w porównaniu z sekwencjami genów 16S rRNA, *rpoB*, *hsp60* i *sodA*. Sekwencja genu *gap* pozwoliła na zróżnicowanie gatunków blisko spokrewnionych, *S. caprae* i *S. capitis*, co nie było możliwe w oparciu o sekwencję 16S rDNA.

2.4. Sekwencja genu *hsp60* jako marker genetyczny stosowany w klasyfikacji i identyfikacji gronkowców

Pierwsze badania dotyczące możliwości identyfikacji gronkowców na podstawie analizy sekwencji genu *hsp60* zostały przeprowadzone przez G o h a i wsp. [14]. Gen *hsp60* koduje 60 kDa białko szoku cieplnego, określane także jako HSP60 lub GroEL. Białko to towarzyszy przy prawidłowym fałdowaniu białek i występuje w komórkach organizmów prokariotycznych jak i eukariotycznych. *Hsp60* reprezentuje gen metabolizmu podstawowego (housekeeping gene) i ze względu na wysoce konserwatywny charakter jest użytecznym markerem do badań filogenetycznych [25]. K w o k i wsp. [26] stwierdzili, że podobieństwo sekwencji fragmentu genu *hsp60* o wielkości 600 pz 28 gatunków gronkowców wynosi od 74 do 93%. Na podstawie analizy sekwencji fragmentu genu *hsp60* czterdziestu gatunków i podgatunków gronkowców skonstruowano dendrogram. Wyodrębniono 6 grup reprezentowanych przez następujące gatunki:

S. aureus, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. saprophyticus*, *S. intermedius*, *S. sciuri*. Otrzymane wyniki wykazują zgodność z rezultatami uzyskanymi na podstawie sekwencji genu 16S rRNA [26]. Zaproponowano różnicowanie gatunków gronkowców na podstawie analizy restrykcyjnej fragmentu genu *hsp60*. Produkt amplifikacji o wielkości 550 pz uzyskano dla 12 szczepów typowych reprezentujących najczęściej izolowane gatunki gronkowców. W wyniku analizy restrykcyjnej wyżej wymienionego amplikonu enzymem *AluI* otrzymano profile DNA składające się z 1–4 fragmentów, które były charakterystyczne dla 12 szczepów typowych (tabela II). Metodę tą wykorzystano do określenia przynależności gatunkowej 89 izolatów gronkowców wyosobnionych z materiałów pobranych od ludzi leczonych w brazylijskich szpitalach. Zidentyfikowano 11 gatunków gronkowców. Dla izolatów należących do gatunków *S. capitis*, *S. cohnii*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. saprophyticus*, *S. schleiferi*, *S. simulans*, *S. xylosum* i *S. warneri* jak i dla szczepów referencyjnych odpowiadającego im gatunku otrzymano takie same profile DNA [2]. W 2008 zastosowano analizę RFLP genu *hsp60* do identyfikacji szczepów wyizolowanych z mleka pobranego od krów z zapaleniem gruczołu mlekowego [40]. W wyniku przeprowadzonej analizy restrykcyjnej enzymem *AluI* uzyskano dla szczepów *S. chromogenes*, *S. hyicus* i *S. capitis* bardzo podobne wzory DNA. Brak satysfakcjonujących rezultatów, skłonił autorów do zastosowania dwóch dodatkowych enzymów restrykcyjnych, *HindIII* i *PvuII*, co umożliwiło różnicowanie wyżej wymienionych gatunków.

2.5. Polimorfizm genu *dnaJ* wykorzystany w identyfikacji *Staphylococcus* spp.

S h a h i wsp. [41] zaproponowali identyfikację gronkowców na podstawie zróżnicowania sekwencji wewnętrznej obszaru genu *dnaJ*. Gen koduje białko szoku cieplnego DnaJ określane również jako Hsp40. Podobieństwo fragmentu sekwencji (883 pz) genu *dnaJ* 45 typowych szczepów gronkowców wynosi 77,6%, co wskazuje na jego wyższy potencjał różnicujący niż genów 16S rRNA, *rpoB*, *hsp60* i *sodA*. Sekwencja wyżej wymienionego fragmentu genu *dnaJ* nie pozwala jednak na zróżnicowanie podgatunków w obrębie *S. capitis*, *S. carnosus*, *S. hominis*, *S. saprophyticus*, *S. schleiferi* i *S. sciuri* ze względu na bardzo wysokie podobieństwo (97,3%). Możliwe jest natomiast zróżnicowanie *S. aureus* subsp. *aureus* i *S. aureus* subsp. *anaerobius* oraz *S. cohnii* subsp. *cohnii* i *S. cohnii* subsp. *urealyticus*. Dendrogram utworzony na podstawie podobieństwa sekwencji genu *dnaJ* wykazał istnienie ośmiu grup w obrębie rodzaju *Staphylococcus*: *S. sciuri*, *S. simulans*, *S. saprophyticus*, *S. hyicus-S. intermedius*, *S. haemolyticus*, *S. epidermidis*, *S. aureus*, *S. lugdunensis*. W 2008 r. H a u s c h i l d

i Stepanovic [16] zaproponowali identyfikację gronkowców na podstawie analizy restrykcyjnej wewnętrznego obszaru genu *dnaJ*. Zastosowanie enzymów restrykcyjnych *XapI* i *Bsp143I* pozwala na uwidocznienie różnic pomiędzy profilami DNA 41 referencyjnych szczepów (tabela II). Do badań zostały również włączone 23 izolaty kliniczne. Zaproponowana metoda umożliwiła identyfikację wszystkich szczepów. Analiza wykazała, że szczepy należące do gatunków *S. aureus*, *S. cohnii* subsp. *urealyticus*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. sciuri*, *S. vitulinus* mają takie same profile DNA jak odpowiadający im szczep gatunku referencyjnego. Poprawność identyfikacji potwierdzono stosując analizę restrykcyjną genu *gap* oraz sekwencji genu 16S rRNA.

2.6. Różnicowanie gatunków gronkowców na podstawie sekwencji genu *tuf*

Ze względu na wysoce konserwatywny charakter genu *tuf*, analiza jego sekwencji może być stosowana do wykrywania filogenetycznych relacji między gatunkami gronkowców. Gen *tuf*, koduje czynnik Tu (EF-Tu) uczestniczący w procesie elongacji łańcucha peptydowego. Martineau i wsp. [29] zsekwencjonowali fragment genu *tuf* o wielkości 884 par zasad następujących gatunków: *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. warneri*, *S. simulans*, *S. capitis*, *S. saprophyticus*, *S. cohnii*, *S. auricularis*, *S. lugdunensis*. Stwierdzono, że podobieństwo sekwencji wynosi od 89 do 97%. Rezultaty tych badań pozwoliły na zaprojektowanie starterów i uzyskanie produktu amplifikacji o wielkości 370 pz dla 27 referencyjnych szczepów gronkowców z kolekcji ATCC. Największe podobieństwo sekwencji fragmentów genu *tuf* stwierdzono dla szczepów należące do gatunków *S. haemolyticus* i *S. hominis* oraz *S. capitis* i *S. epidermidis*, natomiast największe różnice odnotowano między szczepami *S. auricularis* i *S. haemolyticus* oraz *S. auricularis* i *S. lugdunensis*. Heikens i wsp. [18] wykazali, że różnicowanie gatunków w oparciu o sekwencję genu *tuf* odznacza się wyższym potencjałem różnicującym niż w oparciu o sekwencję genów *sodA* i 16S RNA. Wyniki uzyskane przez Martineau i wsp. [29] pozwoliły na opracowanie przez inną grupę badaczy [24] metody RFLP umożliwiającej identyfikację 11 najczęściej izolowanych gatunków gronkowców (tabela II).

2.7. Diagnostyka gatunków gronkowców w oparciu o polimorfizm genu *sodA*

Poyart i wsp. [35] zaproponowali identyfikację gronkowców na podstawie analizy sekwencji genu *sodA*, kodującego dysmutazę ponadtlenkową. Fragment tego genu o wielkości 429 pz umożliwia różnicowanie 40 typowych szczepów gronkowców (tabela II). Wyniki

analizy sekwencji genu *sodA* pozwoliły na skonstruowanie drzewa filogenetycznego podobnego do uzyskanego na podstawie analizy sekwencji 16S rDNA oraz *hsp60*. Sivadoni i wsp. [43] wykorzystali analizę częściowej sekwencji genu *sodA* do identyfikacji gronkowców koagulazo-ujemnych wyizolowanych z materiałów pobranych od ludzi z zakażeniem kości i stawów. Porównano uzyskane sekwencje nukleotydowe z zamieszczonymi w bazie danych sekwencjami szczepów referencyjnych i typowych, i na tej podstawie ustalono, że izolaty należały do *S. epidermidis*, *S. warneri*, *S. capitis*, *S. hominis*, *S. lugdunensis*, *S. haemolyticus*, *S. caprae*, *S. pasteurii*, *S. simulans* i *S. cohnii*.

2.8. Identyfikacja na podstawie sekwencji genu *rpoB*

Gen metabolizmu podstawowego *rpoB*, koduje podjednostkę beta polimerazy RNA. Analiza pełnej sekwencji genu *rpoB* kilku gatunków gronkowców wykazała, że może ona być dogodnym markerem służącym do badań taksonomicznych i filogenetycznych [9]. Do dalszych analiz został wybrany fragment o wielkości 751 pz odznaczający się polimorfizmem, porównywanie sekwencji 29 gatunków gronkowców wykazało podobieństwo wynoszące 71,6–93,6% (tabela II). Wyniki przeprowadzonych badań pozwoliły na utworzenie drzewa filogenetycznego i wyłonienie dziewięciu grup: *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *S. simulans*, *S. intermedius*, *S. hyicus*, *S. sciuri*, *S. auricularis*, *S. aureus* i *S. caseolyticus*. W 2009 r. Sampimom i wsp. z powodzeniem zidentyfikowali 172 szczepy wyizolowane z mleka krowiego na podstawie sekwencji genu *rpoB*, zaliczono je do 17 gatunków gronkowców. Najliczniej były reprezentowane: *S. chromogenes*, *S. epidermidis*, *S. xylosum*, *S. warneri* i *S. equorum*. Równolegle, podjęto próbę identyfikacji izolatów przy zastosowaniu testów komercyjnych API Staph ID 32 (bioMérieux, France) oraz Staph-Zym (Rosco, Taastrup, Denmark). Wykazano, że przy użyciu API Staph ID 32 poprawnie zidentyfikowano 41% izolatów, a przy Staph-Zym 31% izolatów. Uzyskane wyniki jednoznacznie wykazały konieczność stosowania metod molekularnych w identyfikacji gronkowców pochodzenia zwierzęcego, ponieważ różnicowanie w oparciu o testy komercyjne obarczone jest wysokim odsetkiem nieprawidłowo sklasyfikowanych szczepów.

3. Zastosowanie reakcji PCR w czasie rzeczywistym w diagnostyce gronkowców

Technika real-time PCR umożliwia identyfikację bakterii po 3–4 godzinach, liczonych od pobrania materiału. Zaletą tej metody jest również czułość, zaś wadą możliwość identyfikacji tylko wybranych gatunków

gronkowców. Kobayashi i wsp. [23] zaproponowali identyfikację izolatów *S. aureus* i *S. epidermidis* ze starterami zaprojektowanymi dla sekwencji *tuf*. Natomiast Iwase i wsp. [20] zastosowali startery komplementarne do sekwencji *sodA* w celu identyfikacji szczepów należących do gatunku *S. epidermidis*. Ta sama grupa japońskich badaczy wykazała możliwość różnicowania trzech gatunków *S. capitis*, *S. haemolyticus*, *S. warneri* na podstawie analizy krzywej topnienia [19]. Natomiast Skow i wsp. [44] stwierdzili możliwość identyfikacji 9 najczęściej izolowanych gatunków gronkowców z materiałów klinicznych (*S. aureus*, *S. capitis*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. lugdunensis*, *S. schleiferi*, *S. simulans*, *S. warneri*) przy zastosowaniu reakcji real-time PCR ze starterami komplementarnymi do nukleotydów w pozycjach 28–44 oraz 309–290 sekwencji 16S rDNA. Metodę real-time PCR zweryfikowano testując przynależność gatunkową 37 izolatów gronkowców koagulazo-ujemnych i 56 szczepów *S. aureus*. Należy pokreślić, że wszystkie izolaty *S. aureus* zostały poprawnie zidentyfikowane. Jeden szczep *S. capitis* został zidentyfikowany jako *S. epidermidis*, natomiast pozostałe gronkowce koagulazo-ujemne zostały poprawnie zidentyfikowane.

4. Wykorzystanie spektrometrii mas w identyfikacji gronkowców

W ostatnich latach pojawiły się doniesienia o możliwości wykorzystania spektroskopii mas w diagnostyce laboratoryjnej. Spektrometria mas typu MALDI-TOF polega na analizie składu białek komórkowych, głównie tych występujących w dużych ilościach w komórce bakteryjnej jak białka rybosomalne i umożliwia automatyczną identyfikację mikroorganizmów na podstawie profilu białkowego. Bergeron i wsp. [4] zastosowali spektrometrię mas typu MALDI-TOF do różnicowania gronkowców, a uzyskane wyniki porównali z identyfikacją uzyskaną na podstawie analizy sekwencji genów *tuf* i *gap*. Stwierdzono, że 138 szczepów zostało poprawnie zidentyfikowanych, 4 nieprawidłowo, a pozycji taksonomicznej 39 izolatów nie ustalono. Należy zaznaczyć, że 5 gatunków gronkowców nie zostało włączonych do bazy danych spektrometru mas. Procent poprawnie zidentyfikowanych szczepów wyniósł 81,5%. Autorzy podkreślają, że spektrometria mass umożliwia szybką oraz tańszą identyfikację bakterii, niż ma to miejsce w przypadku analiz molekularnych opartych na bezpośrednim sekwencjonowaniu genu. Jednakże, różnicowanie gronkowców na podstawie sekwencji genu *tuf* jest znacznie bardziej wiarygodne i umożliwia identyfikację wszystkich izolatów. Autorzy wskazują na konieczność poszerzenia bazy danych spektrometru mas o nowo opisane oraz rzadko izolowane gatunki gronkowców,

co niewątpliwie przyczyniłoby się do wzrostu odsetka prawidłowo zidentyfikowanych szczepów. Wyższą efektywność identyfikacji uzyskali Dupont i wsp. [11]. Badaniami objęli 230 szczepów gronkowców reprezentujących 20 gatunków. Prawidłowo zidentyfikowano 93,2% szczepów, przy czym po wykluczeniu gatunków, które nie figurowały w bazie danych spektrometru mas, odsetek poprawnie zidentyfikowanych szczepów wzrósł do 97%. Dubois i wsp. [10] również uzyskali bardzo wysoki odsetek prawidłowo zidentyfikowanych szczepów (99,3%), wśród 152 izolatów, jedynie jednego pozycja taksonomiczna nie została ustalona. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że spektrometria mas typu MALDI-TOF daje możliwość wiarygodnej identyfikacji gronkowców.

5. Podsumowanie

W ciągu ostatnich kilkunastu lat zanotowano olbrzymi postęp w identyfikacji i filogenetycznej klasyfikacji gronkowców. Zastosowanie metody bezpośredniego sekwencjonowania konserwatywnych genów stało się dogodnym sposobem wiarygodnej identyfikacji gronkowców, określenia pozycji nowego gatunku w obrębie rodzaju oraz rekonstrukcji filogenezy tej grupy bakterii. Uważa się, że techniki oparte na analizie sekwencji genów metabolizmu podstawowego, powinny być uznane za złoty standard w identyfikacji gronkowców i stanowić metody referencyjne. Liczne zespoły badawcze podejmują próby opracowania metod identyfikacji gronkowców w oparciu o technikę RFLP, która umożliwiłaby analizę większej liczby szczepów w krótszym czasie niż to ma miejsce w przypadku sekwencjonowania. Wydaje się, że największy potencjał różnicujący ma metoda oparta na analizie restrykcyjnej fragmentu genu *dnaJ*. Obecnie szczególnym zainteresowaniem cieszą się metody identyfikacji gronkowców prowadzone w oparciu o technikę real-time PCR. Niewątpliwą zaletą tej metody jest czułość, szybkość wykonania i łatwość interpretacji uzyskanych wyników. Duże nadzieje wiąże się również z spektrometrią mas, która mogłaby mieć większe zastosowanie w diagnostyce laboratoryjnej.

Piśmiennictwo

1. Al Masalma M., Raoult D., Roux V.: *Staphylococcus massiliensis* sp. nov., isolated from a human brain abscess. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **60**, 1066–1072 (2010)
2. Barros E.M., Iório N.L.P., de Freire Bastos M.C., Santos K.R.N., Giambiagi-deMarval M.: Species-level identification of clinical staphylococcal isolates based on polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis of a partial *groEL* gene sequence. *Diag. Microbiol. Infec. Dis.* **59**, 251–257 (2007)

3. Becker K., Harmsen D., Mellmann A., Meier Ch., Schumann P., Peters G., von Eiff Ch.: Development and evaluation of a quality-controlled ribosomal sequence database for 16S ribosomal DNA-based identification of *Staphylococcus* Species. *J. Clin. Microbiol.* **42**, 4988–4995 (2004)
4. Bergeron M., Dauwalder O., Gouy M., Freydiere A.-M., Bes M., Meugnier H., Benito Y., Etienne J., Lina G., Vandenesch F., Boisset S.: Species identification of staphylococci by amplification and sequencing of the *tuf* gene compared to the *gap* gene and by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **30**, 343–354 (2011)
5. Chaves F., García-Álvarez M., Sanz F., Alba C., Otero J.R.: Nosocomial spread of a *Staphylococcus hominis* subsp. *novobiosepticus* strain causing sepsis in a neonatal intensive care unit. *J. Clin. Microbiol.* **43**, 4877–4879 (2005)
6. Couto I., Pereira S., Miragala M., Sanches I.S., Lencastre H.: Identification of clinical staphylococcal isolates from humans by internal transcribed spacer PCR. *J. Clin. Microbiol.* **39**, 3099–3103 (2001)
7. De Bel A., van Hoorde K., Wybo I., Vandoorlaer K., Echahidi F., Brand E., Schummamm P., Ieven M., Soetens O., Piérard D., Vandamme P.: *Staphylococcus jettensis* sp. nov., a novel coagulase-negative staphylococcal species isolated from human clinical. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **1**, doi: 10.1099/ijss.0.044438-0 (2013)
8. de Silva G.D., Kantzanou M., Justice A., Massey R.C., Wilkinson A.R., Day N.P., Peacock S.J.: The *ica* operon and biofilm production in coagulase-negative Staphylococci associated with carriage and disease in a neonatal intensive care unit. *J. Clin. Microbiol.* **40**, 382–388 (2002)
9. Drancourt M., Raoult D.: *rpoB* Gene Sequence-Based Identification of *Staphylococcus* species. *J. Clin. Microbiol.* **40**, 1333–1338 (2002)
10. Dubois D., Leyssene D., Chacornac J.P., Kostrzewa M., Schmit P.O., Talon R., Bonnet R., Delmas J.: Identification of a variety of *Staphylococcus* species by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol.* **48**, 941–945 (2010)
11. Dupont C., Sivadon-Tardy V., Bille E., Dauphin B., Beretti J.L., Alvarez A.S., Degand N., Ferroni A., Rottman M., Herrmann J.L., Nassif X., Ronco E., Carbonnelle E.: Identification of clinical coagulase-negative staphylococci, isolated in microbiology laboratories, by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry and two automated systems. *Clin. Microbiol. Infect.* **16**, 998–1004 (2010)
12. Frank K.L., del Pozo J.L., Pater R.: From clinical microbiology to infection pathogenesis: how daring to be different works for *Staphylococcus lugdunensis*. *Clin. Microbiol. Rev.* **21**, 111–133 (2008)
13. Ghebremedhin B., Layer F., König W., König B.: Genetic classification and distinguishing of *Staphylococcus* species based on different partial *gap*, 16S rRNA, *hsp60*, *rpoB*, *sodA*, and *tuf* gene sequences. *J. Clin. Microbiol.* **46**, 1019–1025 (2008)
14. Goh S.H., Santucci Z., Kloos W.E., Faltyn M., George C.G., Driedger D., Hemmingsen S.M.: Identification of *Staphylococcus* species and subspecies by the chaperonin 60 gene identification method and reverse checkerboard hybridization. *J. Clin. Microbiol.* **35**, 3116–3121 (1997)
15. Götz F., Bannerman T., Schleifer K.L.: The genera *Staphylococcus* and *Micrococcus*. (w) The Prokaryotes. Third edition. A Handbook on the biology of bacteria: Firmicutes, Cyanobacteria. red. M. Dworkin., S. Falkow., E. Rosenberig, K.-H. Schleifer., E. Stackebrands, 2006, vol. 4, s. 5–75
16. Hauschild T., Stepanovic S.: Identification of *Staphylococcus* spp. by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of *dnaJ* gene. *J. Clin. Microbiol.* **46**, 3875–3879 (2008)
17. Hauschild T., Stepanović S., Zakrzewska-Czerwińska J.: *Staphylococcus stepanovicii* sp. nov., a novel novobiocin-resistant oxidase-positive staphylococcal species isolated from wild small mammals. *Syst. Appl. Microbiol.* **33**, 183–187 (2010)
18. Heikens E., Fleer A., Paauw A., Florijn A., Fluit A.C.: Comparison of genotypic and phenotypic methods for species-level identification of clinical isolates of coagulase-negative staphylococci. *J. Clin. Microbiol.* **43**, 2286–2290 (2005)
19. Iwase T., Seki K., Shinji H., Mizunoe Y., Masuda S.: Development of a real-time PCR assay for the detection and identification of *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus haemolyticus* and *Staphylococcus warneri*. *J. Med. Microbiol.* **56**, 1346–1349 (2007)
20. Iwase T., Hoshina S., Seki K., Shinji H., Masuda S., Mizunoe Y.: Rapid identification and specific quantification of *Staphylococcus epidermidis* by 5' nuclease real-time polymerase chain reaction with a minor groove binder probe. *Diag. Microbiol. Infect. Dis.* **60**, 217–219 (2008)
21. Kaufman D., Fairchild D.: Clinical microbiology of bacterial and fungal sepsis in very-low-birth-weight infants. *Clin. Microbiol. Rev.* **17**, 638–680 (2004)
22. Kloos W.E., Bannerman T.L.: *Staphylococcus* and *Micrococcus*. (w) Manual of Clinical Microbiology. red. P.R. Murray, E. Baron., M.A. Pfaller., F.C. Tenover, R. Tenover. ASM Press, Washington, 1999, D.C, s. 507
23. Kobayashi N., Bauer T.W., Sakai H., Daisuke Togawa D., Lieberman I.H., Fujishiro T., Procop G.W.: The use of newly developed real-time PCR for the rapid identification of bacteria in culture-negative osteomyelitis. *J. Bone Spine*, **73**, 745–747 (2006)
24. Kontos F., Petinakia E., Spiliopoulou I., Maniatis M., Maniatis A.N.: Evaluation of a novel method based on PCR restriction fragment length polymorphism analysis of the *tuf* gene for the identification of *Staphylococcus* species. *J. Microbiol. Methods*, **55**, 465–469 (2003)
25. Kwok A.Y.C., Su S.-Ch., Reynolds R.P., Bay S.J., Av-Gay Y., Dovichi N.J., Chow A.W.: Species identification and phylogenetic relationships based on partial HSP60 gene sequences within the genus *Staphylococcus*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **49**, 1181–1192 (1999)
26. Kwok A.Y.C., Chow A.W.: Phylogenetic study of *Staphylococcus* and *Micrococcus* species based on partial *hsp60* gene sequences. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53**, 87–92 (2003)
27. Layer F., Ghebremedhin B., König W., König B.: Differentiation of *Staphylococcus* spp. by terminal-restriction fragment length polymorphism analysis of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-encoding gene. *J. Microbiol. Methods*, **70**, 542–549 (2007)
28. Mack D., Rohde H., Harris L.G., Davies A.P., Horstkotte M.A., Knobloch J.K.-M.: Biofilm formation in medical device-related infection. *Inter. J. Art. Organs* **29**, 343–359 (2006)
29. Martineau F., Picard F.J., Danbing K., Paradis S., Roy P.H., Ouellette M., Bergeron M.G.: Development of a PCR Assay for identification of *Staphylococci* at genus and species levels. *J. Clin. Microbiol.* **39**, 2542–2547 (2001)
30. Nováková D., Pantůček R., Hubálek Z., Falsen E., Busse H.J., Schumann P., Sedláček I.: *Staphylococcus microti* sp. nov., isolated from the common vole (*Microtus arvalis*). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **60**, 566–573 (2010)
31. Onni T., Sanna G., Cubeddu G.P., Marogna G., Lollai S., Leori G., Tola S.: Identification of coagulase-negative staphylococci isolated from ovine milk samples by PCR-RFLP of 16S rRNA and *gap* genes. *Vet. Microbiol.* **144**, 347–352 (2011)
32. Pantůček R., Švec P., Dajcs J.J., Machová I., Černohlávková J., Šedoe O., Gelbíčová T., Mašláňová I., Doškař J., Zdráhal Z., Růžičková V., Sedláček I.: *Staphylococcus petrasii* sp. nov.

- including *S. petrasii* subsp. *petrasii* subsp. nov. and *S. petrasii* subsp. *croceilyticus* subsp. nov., isolated from human clinical specimens and human ear infections. *Syst. Appl. Microbiol.* **36**, 90–95 (2013)
33. Piette A., Verschraegen G.: Role of coagulase-negative staphylococci in human disease. *Vet. Microbiol.* **134**, 45–54 (2009)
 34. Pottumarthy S., Schapiro J.M., Prentice J.L., Houze Y.B., Swanzy S.R., Fang F.C., Cookson B.T.: Clinical isolates of *Staphylococcus intermedius* masquerading as methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* **42**, 5881–5884 (2004)
 35. Poyart C., Quesne G., Boumaila C., Trieu-Cuot P.: Rapid and accurate species-level identification of coagulase-negative *Staphylococci* by using the *sodA* gene as a target. *J. Clin. Microbiol.* **39**, 4296–4301 (2001)
 36. Riesen A., Perreten V.: *Staphylococcus rostri* sp. nov., a haemolytic bacterium isolated from the noses of healthy pigs. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **60**, 2042–2047 (2010)
 37. Rodhe H., Mack D., Christner M., Burdelski Ch., Franke G., Knobloch J.K.-M.: Pathogenesis of staphylococcal device-related infections: from basic science to new diagnostic, therapeutic and prophylactic approaches. *Rev. Med. Microbiol.* **17**, 45–54 (2006)
 38. Ross T.L., Fuss E.P., Harrington S.M., Cai M., Perl T.M., Merz W.G.: Methicillin-resistant *staphylococcus caprae* in a neonatal intensive care unit. *J. Clin. Microbiol.* **43**, 363–367 (2005)
 39. Sampimon O.C., Zadoks R.N., De Vlieghe S., Supre K., Haesebrouck F., Barkema H.W., Sol J., Lam T.J.G.M.: Performance of API Staph ID 32 and Staph-Zym for identification of coagulase-negative staphylococci isolated from bovine milk samples. *Vet. Microbiol.* **136**, 300–305 (2009)
 40. Santos O.C.S., Barros E.M., Brito M.A.V.P., de Freire Bastos M.C., dos Santos K.N., Giambiagi-deMarval M.: Identification of coagulase-negative staphylococci from bovine mastitis using RFLP-PCR of the *groEL* gene. *Vet. Microbiol.* **130**, 134–140 (2008)
 41. Shah M.M., Iihara H., Noda M., Song S.X., Nhung P.H., Ohkusu K., Kawamura Y., Ezaki T.: *dnaJ* gene sequence-based assay for species identification and phylogenetic grouping in the genus *Staphylococcus*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **57**, 25–30 (2007)
 42. Shittu A., Lin J., Morrison D., Kolawole D.: Isolation and molecular characterization of multiresistant *Staphylococcus sciuri* and *Staphylococcus haemolyticus* associated with skin and soft-tissue infections. *J. Med. Microbiol.* **53**, 51–55 (2004)
 43. Sivadon V., Rottman M., Chaverot S., Quincampoix J.-C., Avettand V., de Mazancourt P., Bernard L., Trieu-Cuot P., Feron J.-M., Lortat-Jacob A., Piriou P., Judet T., Gaillard J.-L.: Use of genotypic identification by *sodA* sequencing in a prospective study to examine the distribution of coagulase-negative *Staphylococcus* species among strains recovered during septic orthopedic surgery and evaluate their significance. *J. Clin. Microbiol.* **43**, 2952–2954 (2005)
 44. Skow A., Mangold K.A., Tajuddin M., Huntington A., Fritz B., Thomson R.B., Kaul K.L.: Species-level identification of Staphylococcal isolates by real-time PCR and melt curve analysis. *J. Clin. Microbiol.* **43**, 2876–2880 (2005)
 45. Supré K., De Vlieghe S., Cleenwerck I., Engelbeen K., Van Trappen S., Piepers S., Sampimon O.C., Zadoks R.N., De Vos P., Haesebrouck F.: *Staphylococcus devriesei* sp. nov., isolated from teat apices and milk of dairy cows. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **60**, 2739–2744 (2010)
 46. Takahashi T., Satoh I., Kikuchi N.: Phylogenetic relationships of 38 taxa of the genus *Staphylococcus* based on 16S rRNA gene sequence analysis. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **49**, 725–728 (1999)
 47. Taponen S., Supré K., Piessens V., van Coillie E., de Vlieghe S., Koort J.M.K.: *Staphylococcus agnetis* sp. nov., a coagulase-variable species from bovine subclinical and mild clinical mastitis. *J. Syst. Evol. Microbiol.* **62**, 61–65 (2012)
 48. Van Der Zwet W.C., Debets-Ossenkopp Y.J., Reinders E., Kapi M., Savelkoul P.H.M., Van Elburg R.M., Hiramatsu K., Vandenbroucke-Grauls C.M.E.: Nosocomial spread of a *Staphylococcus capitis* strain with heteroresistance to vancomycin in a neonatal intensive care unit. *J. Clin. Microbiol.* **40**, 2520–2525 (2002)
 49. van Hoovels L., Vankeerberghen A., Boel A., van Vaerenbergh K., De Beenhouwer H. First case of *Staphylococcus pseudintermedius* infection in a human.: *J. Clin. Microbiol.* **44**, 4609–4612 (2006)
 50. Widerström M., Wiström J., Ferry S., Karlsson C., Monsen T.: Molecular epidemiology of *Staphylococcus saprophyticus* isolated from women with uncomplicated community-acquired urinary tract infection. *J. Clin. Microbiol.* **45**, 1561–1564 (2007)
 51. Yugueros J., Temprano A., Berzal B., Sanchez M., Herranz C., Luengo J.M., Naharro G.: Glyceraldehyde-3-Phosphate dehydrogenase-encoding gene as a useful taxonomic tool for *Staphylococcus* spp. *J. Clin. Microbiol.* **38**, 4351–4355 (2000)
 52. Yugueros J., Temprano A., Sanchez M., Luengo J.M., Naharro G.: Identification of *Staphylococcus* spp. by PCR-restriction fragment length polymorphism of gap gene. *J. Clin. Microbiol.* **39**, 3693–3695 (2001)
 53. Zadoks R.N., Jeffrey L., Watts J.L.: Species identification of coagulase-negative staphylococci: genotyping is superior to phenotyping. *Vet. Microbiol.* **134**, 20–28 (2009)