

Identyfikacja 20 nowych rejonów zmiennych w genomach
Staphylococcus aureus przydatnych do genotypowania
koagulazo-dodatnich gronkowców

Identification of 20 new variable regions in the genomes
of *Staphylococcus aureus* useful for genotyping
coagulase-positive staphylococci

Roman Kotłowski

Katedra Biotechnologii Molekularnej i Mikrobiologii, Politechnika Gdańska

W pracy zidentyfikowano 20 nowych rejonów zmiennych w genomach gronkowca złocistego przydatnych do badań epidemiologicznych metodą PCR. Teoretyczna analiza 35 genomów metodą PCR z udziałem 20 nowych regionów zmiennych pozwoliła na uzyskanie większej liczby genotypów w porównaniu do dwóch metod referencyjnych: REA-PFGE z udziałem endonukleazy *Sma*I oraz metody MLVA z udziałem 16 rejonów zmiennych.

Słowa kluczowe: *Staphylococcus aureus*, genotypowanie, REA-PFGE, MLVA

ABSTRACT

Introduction: *Staphylococcus aureus* is the most frequently recognized microorganism responsible for hospital infections.

Materials and Methods: Thirty five genomes were aligned and screened for the presence of variable regions suitable for PCR in order to design a new genotyping method. For comparative analysis, *Sma*I-REA-PFGE and MLVA were used.

Results: Twenty new regions with various lengths were identified from multiple sequence alignment of the genomic DNA. Subsequently, 20 couples of primers were designed for the amplification of variable regions for the PCR method. Comparative analysis of both PCR genotyping methods and *Sma*I-REA-PFGE revealed higher number of genotypes for new method with the use of 35 genomic sequences.

Conclusions: The simplicity and easy interpretation of the results in the designed PCR method using 20 new variable regions makes it an attractive alternative to *Sma*I-REA-PFGE and MLVA.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, genotyping, REA-PFGE, MLVA.

WSTĘP

Gronkowiec złocisty jest gatunkiem najczęściej wywołującym zakażenia szpitalne (2). Z uwagi dużą liczbę toksyn oraz wielolekooporność, szczepy *S. aureus* stały się głównym problemem medycznym na świecie (1, 3). Z tego też względu, identyfikacja dominujących izolatów *S. aureus* jest kluczowa w zapobieganiu rozprzestrzeniania się koagulazo-dodatnich gronkowców. Pomimo dużej siły różnicującej metody REA-PFGE (ang. Restriction Enzyme Analysis - Pulsed Field Gel Electrophoresis), technika ta nie pozwala na wiarygodne porównywanie wzorów restrykcyjnych uzyskanych w różnych laboratoriach diagnostycznych. Do niedawna, możliwe jedynie było określenie typu fagowego oraz porównanie antybiogramów w epidemiologicznych badaniach dotyczących zakażeń gronkowcami. W 2012 roku, Sobral i wsp. (7) opracowali metodę genotypowania koagulazo-dodatnich gronkowców w oparciu o amplifikację tandemowych powtórzeń DNA, zwaną MLVA (ang. Multiple-Locus Variable number tandem repeat Analysis) o porównywalnej sile różnicującej do metody REA-PFGE.

W niniejszej pracy, bazującej na porównaniu całych genomów *S. aureus*, zidentyfikowano nowe rejony zmienne, inne niż w metodzie MLVA, które mogą być alternatywnie wykorzystane w reakcji PCR do różnicowania genomów koagulazo-dodatnich gronkowców.

MATERIAŁ I METODY

Do porównania 35 genomowych sekwencji uzyskanych z Genbanku NCBI (ang. National Centre for Biotechnology Information) zastosowano program komputerowy MAFFT v. 7.271 (4). Następnie, w zakonserwowanych ewolucyjnie rejonach genomowego DNA okalających rejony zmienne (Rycina 1), zaprojektowano 20 par sekwencji oligonukleotydowych do reakcji PCR (Tabela 1). Dla celów porównawczych zastosowano dwie metody diagnostyczne, metodę REA-PFGE, która obejmowała trawienie genomowego DNA enzymem restrykcyjnym *SmaI* przy wykorzystaniu programu Clone Manager 7 oraz technikę MLVA według publikacji Sobral i wsp. (7) z udziałem 16 rejonów zmiennych.

WYNIKI

Teoretyczne wyniki różnicowania z udziałem nowej metody pozwoliły na uzyskanie 23 genotypów (Tabela 2). W metodzie MLVA liczba genotypów była równa 20 (Tabela 3), a dla metody referencyjnej REA-PFGE uzyskano 21 genotypów (Rycina 2), przy punkcie odcięcia prążków równym 10,000 pz oraz homologii genotypów równej 99% dla wszystkich trzech metod. Bardziej wyraźne różnice pomiędzy genotypami uzyskano dla nowej metody genotypowania (Rycina 3) oraz MLVA (Rycina 4). W analizie porównawczej wielkości fragmentów DNA po reakcji PCR obejmującej nową metodę genotypowania oraz MLVA, oznaczone wielkości produktów PCR można rozróżnić na podstawie teoretycznych wartości zawartych w Tabeli 3 oraz Tabeli 4, przy czym większe różnice we wielkościach fragmentów PCR uzyskano dla nowej metody. W szczególności, różnicowanie genomów CP007676 od CP007674 lub CP007890 od CP007657 można wykonać przy użyciu elektroforezy w żelu agarozowym. Warto również zaznaczyć, iż w metodzie MLVA dla trzech szczepów o numerach CP013616, CP013619 oraz CP013621 nie uzyskano fragmentu PCR *in silico* dla pary starterów o numerze 15, co wskazuje na obecność delekcji w rejonie SA2039 dla 3 z 35 analizowanych genomów *S. aureus*.



Tabela I. Sekwencje par starterów do reakcji PCR występujących na zewnątrz (flankujących) 20 nowych rejonów zmiennych.

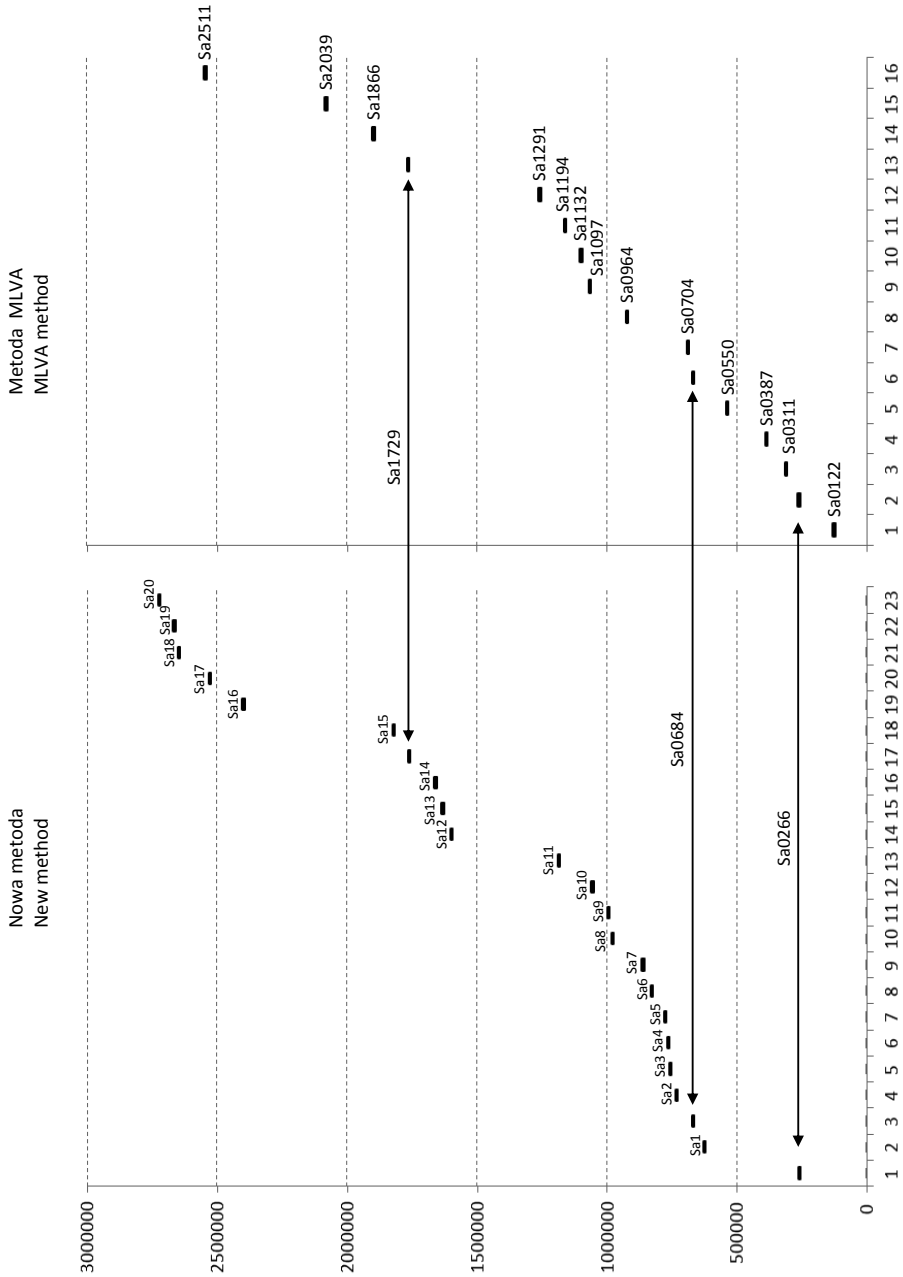
Table I. Sequences of PCR primers pairs flanking 20 new variable regions.

L. p.	Sekwencje par starterów oligonukleotydowych zaprojektowane do metody PCR	Tm
1.	SA1F 5' GTAGAAGCATTACAAGATGATGACTTTGTATTTGAC SA1R 5' CAATAGCCTTTCAAATAATTTAGTGCAATTTTATGATATTTGC	62 °C (59 °C)
2.	SA2F 5' CGACCGCAATCCACAAAAGCACAAGCA SA2R 5' GTGATCACCCCAACCTGTTAATCCGATGT	68 °C
3.	SA3F 5' GTGATTTAACGAGCTTGGGACAGAAAACAAAG SA3R 5' AGCTATTACTATAAAAAACAGCAGTAAGATATTTCC	59 °C
4.	SA4F 5' GGGATAATTTGAAATCAAATATAACTTTATTCGACAGTTTGAAC SA4R 5' ATCAAATGCCTCCCTCAAAGTAGACATTG	62 °C (59 °C)
5.	SA5F 5' GGATACTTATCAATCATACCTCTTTAACAACAGTGA SA5R 5' CAGAAGATATTAATCAAACAAAACAAGATATCCAAGATACAC	65 °C (62 °C)
6.	SA6F 5' ACCCATGTATAAGGATATCTGAAGTAGATTG SA6R 5' CATTAGCCATTGCAGTGGCAAGCA	65 °C (62 °C)
7.	SA7F 5' GCTGAGATAATTTAATGAATCTCAGAACTCCTTTTG SA7R 5' CTAATAGCTCACTCGGTACACCTCG	65 °C (59 °C)
8.	SA8F 5' GCATAAGGGAGTGGGACAGAAATGA SA8R 5' GAGGGAGCCTAGGATAAAATTAACGTC	65 °C
9.	SA9F 5' GTAATGGTCTTCCACATTAGCCAC SA9R 5' GACATCACAATGTCTAGGCTCTACA	62 °C (62 °C)
10.	SA10F 5' GCAAACATACTTTGCACCTCCTGTATAATAAG SA10R 5' GTAGCTACATACAACCGCTCAAATATAG	62 °C (59 °C)
11.	SA11F 5' ACATTTAAGGTGACCTTCATGCCAA SA11R 5' ACATGTGCCAAGACCACCAGCGA	59 °C (59 °C)
12.	SA12F 5' CATTGATTTCACATCTTGGTTGGTTTTTATTTTG SA12R 5' ATGATAGGTGACAAGTATAACAAGACAATTTGTG	59 °C (56 °C)
13.	SA13F 5' GTTGATCCAATCGGTGAGGATGTCACA SA13R 5' CTTGGCTTACTGTTGGTCTTTGAACG	65 °C (59 °C)
14.	SA14F 5' GAACAATTTGAGTTTGAAAAGTAGAAATGATAATGAACC SA14R 5' GACCGTAACCGCAATACCCATACCTA	62 °C
15.	SA15F 5' CCGCAACAACCAACCAAAAGCCA SA15R 5' ACCTCTTTACACTTGCAATAGTACTATTCTATTTTC	62 °C (53 °C)
16.	SA16F 5' GGTGTTAATTTAGCTTGGCTTCTGTTTTGCAGC SA16R 5' CGCAACTGAAGAAACGGTTGCCCT	65 °C (59 °C)
17.	SA17F 5' GGTATCAACAAGTGATAGCATCAAATGGAGATAAAATTAAAGG SA17R 5' CTTTGTGACACTAATCATCTACTTAACAATATCG	62 °C 56 °C
18.	SA18F 5' CAATGCCAAGATTATTTATATGGACTTTTAGAGGCT SA18R 5' GACTCTTAAGTTGTAGTCATCTTACTGCTTATTTATGTTTG	65 °C (62 °C)
19.	SA19F 5' CACGCCGTAAGATGCCTAGATTCCT SA19R 5' GGCTCTTATGCAGTTGGAGCGAAG	68 °C (68 °C)
20.	SA20F 5' TGGTGGTGTAACTCTTGAATCGGAGTC SA20R 5' GAAGTGCATGGTGAATTCAGCAGTAAATC	68 °C (65 °C)

Na szarym tle wyróżniono nukleotydy odpowiedzialne za tworzenie struktur drugorzędowych lub dimerów pomiędzy parami starterów lub w obrębie dwóch cząsteczek tego samego startera oligonukleotydowego. Tm oznacza temperaturę hybrydyzacji sekwencji starterów z matrycowym DNA podczas reakcji PCR.

Highlighted in grey are nucleotides responsible for creation of secondary structures or dimers between primers from one pair or between two molecules of the same primer. Tm indicates hybridization temperature of primers with template DNA during PCR.





Lokalizacja sekwencji zmiennych w genomie *S. aureus* BX571856
 Localization of variable regions in *S. aureus* genome BX571856

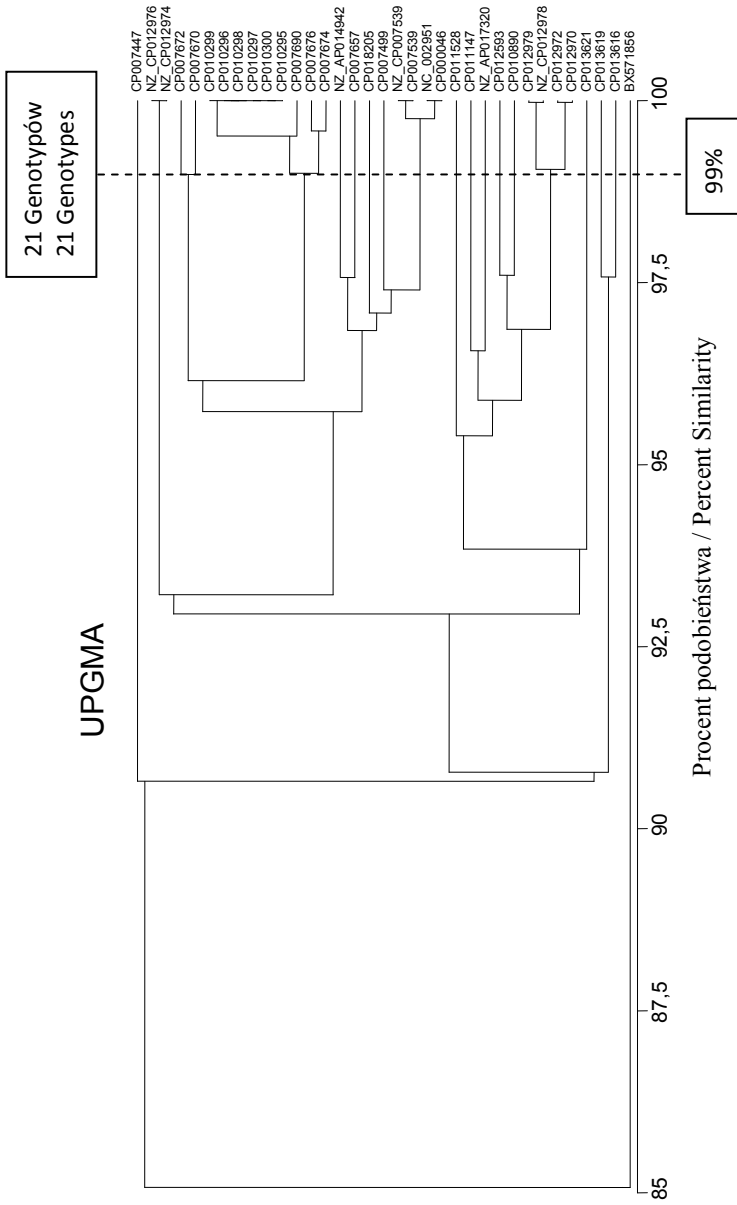
Rycina 1. Nowe i poznane już regiony zmienne dla genomu *Staphylococcus aureus* BX571856.
 Figure 1. New and already known variable regions for *Staphylococcus aureus* genome BX571856.



Tabela II. Teoretyczne wielkości ampikonów w parach zasad dla 20 nowych rejonów zmiennych w nowej metodzie genotypowania dla 35 genomów *S. aureus*.Table II. Theoretical sizes of amplicons in base pairs for 20 new variable regions in new genotyping method for 35 *S. aureus* complete genomes.

Genomy <i>S. aureus</i> <i>S. aureus</i> genomes	Zestawy par starterów / Pairs of primers																			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
BX571856	335	334	346	534	262	388	189	198	433	276	270	204	328	374	536	475	482	849	794	818
CP013616	328	377	538	364	199	580	189	312	439	470	273	204	523	600	817	628	563	425	333	878
CP013619	328	377	540	364	199	580	189	312	439	470	273	204	523	669	817	628	563	425	333	1136
CP013621	328	377	538	364	199	580	189	312	439	470	273	204	523	669	817	628	563	425	333	932
CP000046	666	247	454	361	325	389	214	255	213	150	229	503	315	581	802	787	421	1029	264	938
CP007539	666	247	454	361	325	389	214	255	213	150	229	503	315	581	802	787	421	1029	264	938
NC_002951	666	247	454	361	325	389	214	255	213	150	229	503	315	581	802	787	421	1029	264	938
NZ_CP007539	666	247	454	361	325	389	214	255	213	150	229	503	315	581	802	787	421	1029	264	938
CP007499	496	247	398	360	262	389	189	255	213	150	229	503	315	512	802	628	421	789	529	836
CP007657	666	247	454	360	262	389	239	255	213	150	229	503	315	443	859	628	421	729	460	896
CP007674	666	247	454	360	262	389	239	255	213	150	229	503	315	719	802	628	421	729	391	896
CP007690	666	247	454	360	262	389	239	255	213	150	229	503	315	443	802	628	421	729	264	896
CP010295	666	247	454	360	262	389	239	255	213	150	229	503	315	512	684	469	421	729	264	896
CP010299	666	247	454	360	262	389	239	255	213	150	229	503	315	512	684	469	421	729	264	896
CP010298	666	247	454	360	262	389	239	255	213	150	229	503	315	512	684	469	421	729	264	896
CP010296	666	247	454	360	262	389	239	255	213	150	229	503	315	512	684	469	421	729	264	896
CP010297	666	247	454	360	262	389	239	255	213	150	229	503	315	512	684	469	421	729	264	896
CP010300	666	247	454	360	262	389	239	255	213	150	229	503	315	512	684	469	421	729	264	896
CP007676	666	247	340	360	262	389	239	255	213	150	229	503	315	647	802	628	421	729	264	896
CP007670	666	247	454	360	199	389	239	255	213	150	229	503	315	581	742	628	421	729	391	896
CP007672	666	247	510	360	199	389	189	255	213	150	229	503	315	581	802	628	421	729	391	896
NZ_AP014942	666	248	473	419	451	653	164	256	386	345	354	493	569	443	746	469	455	185	392	1010
CP012970	552	333	402	591	451	653	189	197	331	219	354	501	328	303	740	628	447	1089	126	920
CP012972	553	333	402	589	388	653	189	197	331	219	354	503	328	303	740	628	447	1089	126	920
NZ_CP012978	554	333	346	475	514	653	189	197	329	219	354	561	328	303	853	628	447	1089	126	932
CP012979	554	333	346	590	388	653	189	197	331	219	354	560	328	303	855	628	447	1028	126	932
NZ_CP012974	333	462	402	478	514	389	189	197	327	276	354	562	328	303	798	628	423	969	253	938
NZ_CP012976	333	462	402	478	514	389	189	197	327	276	354	562	328	303	798	628	423	969	253	938
CP010890	333	462	478	306	514	650	189	256	446	219	354	204	467	374	855	628	474	789	380	830
NZ_AP017320	333	419	478	419	514	650	189	256	446	219	354	204	467	374	855	628	474	849	253	830
CP012593	333	419	478	419	514	650	189	256	386	219	354	204	467	374	855	628	474	729	380	830
CP011147	333	419	478	419	325	516	189	256	387	219	354	204	467	374	855	628	364	789	253	830
CP007447	553	247	454	360	262	388	189	255	213	150	229	503	328	512	685	629	482	789	518	890
CP011528	666	290	374	419	199	721	164	197	330	219	354	620	315	512	746	628	367	789	598	842
CP018205	666	247	454	361	262	389	214	255	213	150	229	503	315	443	684	787	420	1029	253	830



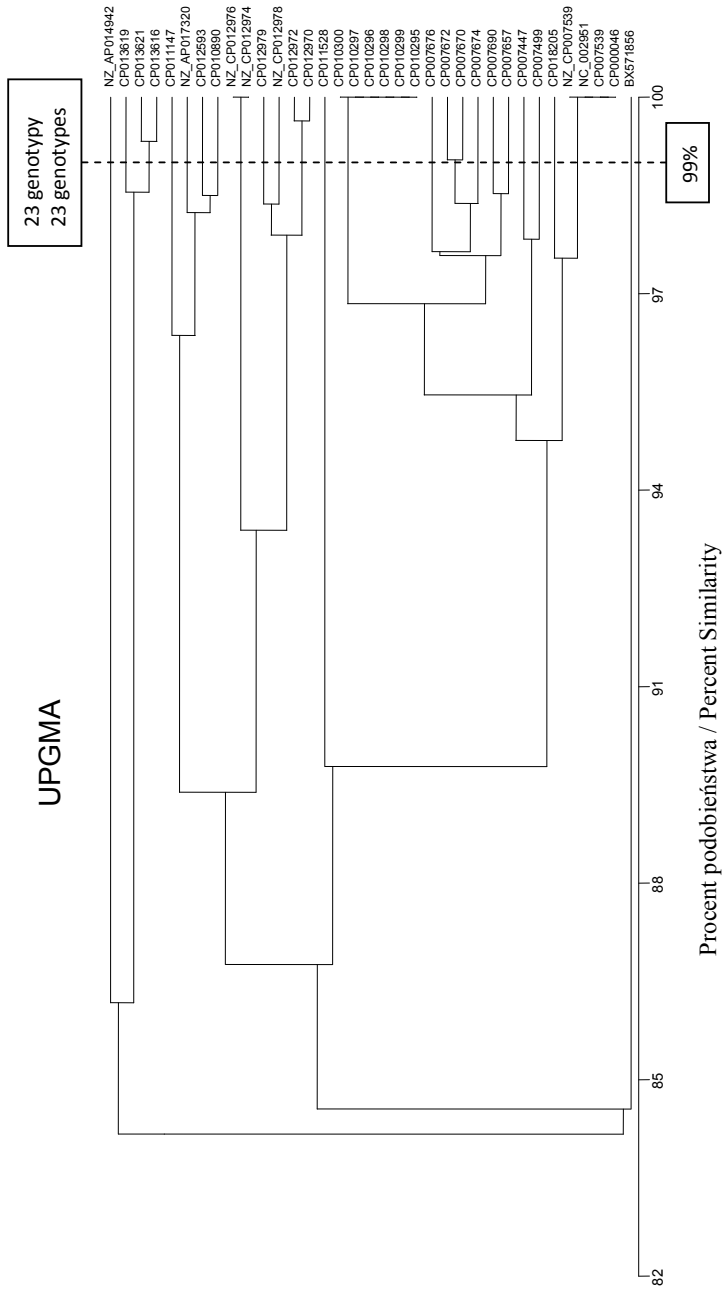


Rycina 2. Drzewo filogenetyczne utworzone dla 35 genomów *S. aureus* na podstawie metody REA-PFGE z udziałem enzymu *Sma*I.

Figure 2. Phylogenetic tree created for 35 *S. aureus* genomes based on REA-PFGE method using *Sma*I endonuclease.

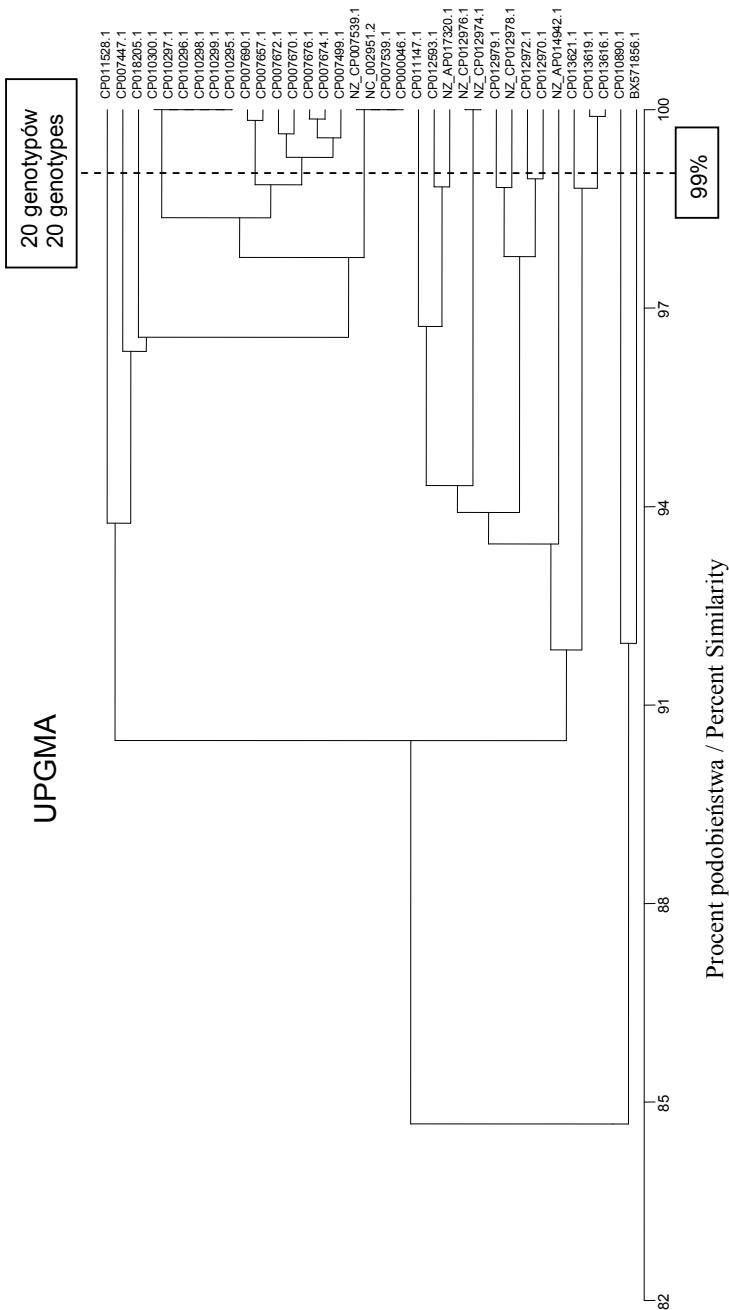
Tabela III. Teoretyczne wielkości amplikonów w parach zasad dla 16 rejonów zmiennych w metodzie genotypowania MLVA dla 35 genomów *S. aureus*.Table III. Theoretical sizes of amplicons in base pairs for 16 variable regions in MLVA genotyping method for 35 *S. aureus* genomes.

Genomy <i>S. aureus</i> <i>S. aureus</i> genomes	Zestawy par primerów / Sets of primers															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
BX571856.1	363	465	316	257	824	1092	234	517	243	637	612	738	803	783	338	2220
CP013616.1	240	709	374	309	824	1092	369	554	198	573	806	961	803	943	0	251
CP013619.1	259	709	374	309	824	1092	369	554	198	573	806	961	803	943	0	251
CP013621.1	310	709	374	309	824	1092	369	554	198	573	806	809	803	943	0	251
CP000046.1	335	552	264	362	824	1149	440	430	177	704	612	683	579	1108	281	456
CP007539.1	335	552	264	362	824	1149	440	430	177	704	612	683	579	1108	281	456
NC_002951.2	335	552	264	362	824	1149	440	430	177	704	612	683	579	1108	281	456
NZ_CP007539.1	335	552	264	362	824	1149	440	430	177	704	612	683	579	1108	281	456
CP007499.1	335	552	264	362	824	1149	440	430	177	637	612	683	579	943	281	394
CP007657.1	259	465	264	362	824	1149	440	430	177	637	612	683	579	943	281	456
CP007674.1	335	552	264	362	824	1149	440	430	177	637	612	683	579	943	281	456
CP007690.1	286	465	264	362	824	1149	440	430	177	637	612	683	579	943	281	456
CP010295.1	335	465	264	362	824	1149	440	430	177	637	612	683	579	783	281	456
CP010299.1	335	465	264	362	824	1149	440	430	177	637	612	683	579	783	281	456
CP010298.1	335	465	264	362	824	1149	440	430	177	637	612	683	579	783	281	456
CP010296.1	335	465	264	362	824	1149	440	430	177	637	612	683	579	783	281	456
CP010297.1	335	465	264	362	824	1149	440	430	177	637	612	683	579	783	281	456
CP010300.1	335	465	264	362	824	1149	440	430	177	637	612	683	579	783	281	456
CP007676.1	310	552	264	362	824	1149	440	430	177	637	612	683	579	943	281	456
CP007670.1	335	552	264	362	824	1149	440	430	177	573	612	683	579	943	218	456
CP007672.1	335	552	264	362	824	1149	440	430	177	573	612	683	579	943	281	456
NZ_AP014942.1	310	800	293	309	824	1092	306	430	177	824	877	961	743	783	218	262
CP012970.1	335	465	264	362	824	1092	170	517	133	824	877	877	693	943	218	336
CP012972.1	335	465	264	362	824	1092	170	517	133	757	877	877	693	943	218	456
NZ_CP012978.1	363	388	264	309	824	1092	170	517	133	896	877	1030	693	943	218	456
CP012979.1	363	465	264	309	824	1092	170	517	133	757	877	1030	693	943	218	456
NZ_CP012974.1	310	465	264	309	824	1092	369	640	177	896	612	877	693	943	218	262
NZ_CP012976.1	310	465	264	309	824	1092	369	640	177	896	612	877	693	943	218	262
CP010890.1	335	637	316	257	824	1019	306	640	177	896	877	877	803	943	281	1897
NZ_AP017320.1	240	637	316	257	824	1019	306	603	198	896	877	877	803	943	281	369
CP012593.1	335	637	316	257	824	1019	306	603	198	896	877	877	743	943	281	435
CP011147.1	335	637	206	257	824	1019	306	603	198	704	741	877	743	943	281	311
CP007447.1	259	552	316	309	824	1149	170	430	177	637	612	683	579	943	281	456
CP011528.1	310	552	205	362	824	1092	440	472	177	573	947	738	693	943	218	577
CP018205.1	363	552	264	309	824	1149	706	430	177	637	612	683	579	1108	281	456



Rycina 3. Drzewo filogenetyczne utworzone dla 35 genomów *S. aureus* na podstawie nowej metody genotypowania.

Figure 3. Phylogenetic tree created for 35 genomes of *S. aureus* on the basis of new genotyping method.



Rycina 4. Drzewo filogenetyczne utworzone dla 35 genomów *S. aureus* na podstawie metody MLVA.
Figure 4. Phylogenetic tree created for 35 *S. aureus* genomes based on MLVA method

Przy wyborze sekwencji starterowych flankujących 20 nowych rejonów kierowano się następującymi kryteriami: (i) obecnością co najmniej 11 par GC w każdej sekwencji starterowej, (ii) obecnością jak największej liczby nukleotydów G lub C w obu sekwencjach starterowych, w celu minimalizacji oddziaływań pomiędzy cząsteczkami tego samego startera oligonukleotydowego lub dwóch różnych. Trzymanie się tych kryteriów doboru sekwencji starterowych umożliwia prowadzenie etapu hybrydyzacji z matrycowym DNA w temperaturze 62°C. Pozwoli to na zmniejszenie występowania niekorzystnych struktur drugorzędowych typu „dimer” oraz „hairpin loop” dla jednego lub większej liczby sekwencji starterowych. Ponadto, w celu zapewnienia specyficznej amplifikacji wybranych fragmentów DNA można zastosować termostabilną polimerazę DNA z dodatkiem przeciwciał blokującej aktywność enzymu poniżej 60°C lub termostabilną polimerazę uwięzioną w kapsułkach żelatynowych (5). Zapobiegnie to niepożądanym modyfikacjom sekwencji starterowych zawierających niekorzystne struktury w temperaturze poniżej 60°C. Optymalizacja techniki Multiplex-PCR z udziałem nowych sekwencji starterowych wymaga empirycznego sprawdzenia z powodu dużej liczby kombinacji oddziaływań pomiędzy sekwencjami starterów a matrycowym DNA.

DYSKUSJA

Analiza porównawcza wielkości fragmentów DNA po reakcji PCR dla nowej metody genotypowania oraz techniki MLVA prowadzona będzie na podstawie wyboru teoretycznych wartości przedstawionych w tabeli II i tabeli III. Zaletą nowej metody w porównaniu do techniki MLVA jest większa specyficzność amplifikacji DNA wynikająca z większej liczby par GC w sekwencjach starterowych. Pozwoli to na prowadzenie etapu annealingu sekwencji starterowych z matrycowym DNA w temperaturze 62°C, bez konieczności stosowania mniej specyficznej amplifikacji DNA metodą „touchdown”, jak to ma miejsce w metodzie genotypowania MLVA (7). Inną zaletą nowej, bardziej swoistej metody genotypowania, będzie możliwość wykrywania mieszanych zakażeń w przypadku uzyskania dwóch lub większej liczby prążków DNA zgodnych z oszacowaniem teoretycznym dla specyficznych regionów zmiennych.

Biorąc pod uwagę (i) stopień złożoności oznaczania wyników genotypowania w metodzie *Sma*I-REA-PFGE spowodowany różną interpretacją wyników w poszczególnych laboratoriach (6) (ii) błędnie zaprojektowane sekwencje starterowe otaczające rejon zmienny Sa2039 w metodzie MLVA, oraz (iii) mniej specyficzną amplifikację DNA w metodzie MLVA (przebiegającej w nieco niższej temperaturze annealingu), można stwierdzić iż proponowana nowa metoda genotypowania koagulazo-dodatnich gronkowców z udziałem nowych sekwencji starterowych, będzie lepszą alternatywą w porównaniu do obu metod referencyjnych, jak i w porównaniu do fagotypowania (wykonywanego jedynie w wybranych ośrodkach referencyjnych).

PIŚMIENNICTWO

1. *Couvé-Deacon E, Mons F, Garnier F* i inni. Neonatal Outbreak of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Clone Geraldine: A Bundle of Measures to Halt Transmission. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2017; 38: 749-51.



2. *Dzierżanowska D.* Patogeny bakteryjne zakażeń szpitalnych. W: Zakażenia szpitalne. Red. *D.Dzierżanowska*. Wydawnictwo α -medica press, Bielsko-Biała, 2008, 11.
3. *Kaïret K, Ho E, Van Kerkhoven D* i inni. USA300, A strain of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, crossing Belgium's borders: outbreak of skin and soft tissue infections in a hospital in Belgium. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2017; 36: 905-9.
4. *KatoH K, Misawa K, Kuma K* i inni. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Res* 2002; 15: 3059-66.
5. *Poddar SK, Sawyer MH, Connor JD.* Evaluation of PCR assays in presence of antibody to thermostable DNA polymerases for detection of microbial agents: avoiding false negative results for specimen containing low-titer agent. *J Clin Lab Anal* 1998; 12: 238-41.
6. *Pomorska-Wesołowska M, Małyszczek K, Romaniszyn D* i inni. Molekularna charakterystyka szczepów *Staphylococcus aureus* izolowanych z zakażeń miejsca operowanego u pacjentów południowej Polski. *Med Dosw Microbiol* 2017; 69: 15-25.
7. *Sobral D, Schwarz S, Bergonier D* i inni. 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.

Otrzymano: 4 I 2017

Autor Autora: 80-233 Gdańsk, ul. Narutowicza 11/12, Katedra Biotechnologii Molekularnej i Mikrobiologii, email: romkotlo@pg.gda.pl.