

mgr farm. Paulina Glajzner

Adaptacja bakteryjnych patogenów zwierzęcych do nowego gospodarza - człowieka. Badania na modelu ziarenkowców gramdodatnich.

Adaptation of bacterial animal pathogens to a new host - human. Studies on the model of grampositive cocci.

**Rozprawa na stopień doktora
w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu
w dyscyplinie nauki farmaceutyczne**

Promotor: prof. dr hab. n. farm. Eligia M. Szewczyk
Uniwersytet Medyczny w Łodzi – profesor emerytowany

Promotor pomocniczy: dr n. farm. Magdalena Szemraj
Katedra Diagnostyki Laboratoryjnej i Molekularnej, Zakład Mikrobiologii
Farmaceutycznej i Diagnostyki Mikrobiologicznej, Wydział Farmaceutyczny,
Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Akceptuję:
Eligia M. Szewczyk
(data i podpis promotora) 20.06.23

.....
Magdalena Szemraj, 20.06.23
(data i podpis promotora pomocniczego)



ŁÓDŹ 2023

Podziękowania

Prezentowana rozprawa doktorska przygotowana została pod opieką naukową Pani Profesor dr hab. n. farm. Eligii M. Szewczyk oraz Pani Dr n. farm. Magdalenie Szemraj.

Składam serdeczne podziękowania Pani Profesor dr hab. n. farm. Eligii M. Szewczyk za opiekę naukową, wsparcie merytoryczne, poświęcony czas oraz za ogromną motywację i wiarę w moją osobę w trakcie powstawania tej pracy. Szczególne dziękuję również za całą przekazaną mi przez lata wiedzę oraz inspirację.

Chciałabym podziękować Pani Dr n. farm. Magdalenie Szemraj za wsparcie merytoryczne, pomoc, poświęcony czas a także miłą atmosferę pracy w trakcie realizacji badań.

Dziękuję również Pani Profesor dr hab. Ewie Balcerczak oraz dr n. farm. Marcie Żebrowskiej-Nawrockiej za pomoc w realizacji badań.

Serdeczne podziękowania składam również Kolegom i Koleżankom z Zakładu Mikrobiologii Farmaceutycznej i Diagnostyki Mikrobiologicznej za ogromną życzliwość i miłą atmosferę pracy.

Szczególne podziękowania składam na ręce mojego Męża, za ogromne wsparcie, poświęcony czas i cierpliwość w trakcie powstawania tej rozprawy.

Część danych i wyników zawartych w tej rozprawie doktorskiej zostało opublikowanych w następujących pracach:

- **Glajzner, P.**, Szewczyk, E. M., & Szemraj, M. (2021). Pathogenicity and drug resistance of animal streptococci responsible for human infections [Review]. *Journal of Medical Microbiology*, 70(3), 19, Article 001339.
<https://doi.org/10.1099/jmm.0.001339>
IF = 3,196 MNiSW = 70
- **Glajzner, P.**, Szewczyk, E. M., & Szemraj, M. (2023). Phenotypic and genotypic characterization of antimicrobial resistance in streptococci isolated from human and animal clinical specimens [Short Communication]. *Current Microbiology*, 80:228.
<https://doi.org/10.1007/s00284-023-03337-6>
IF = 2,343 MNiSW = 40
- **Glajzner, P.**, Szewczyk, E. M., & Szemraj, M. (2023). Pathogenic potential and antimicrobial resistance of *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from human and animals [Article]. *Folia Microbiologica*, 13.
<https://doi.org/10.1007/s12223-022-01007-x>
IF = 2,629 MNiSW = 40

SPIS TREŚCI

WYKAZ SKRÓTÓW	1
1. Wstęp	6
1.1. Nabywanie zdolności zakażenia gospodarza innego gatunku – przełamywanie bariery międzygatunkowej	6
1.1.1. Nowe choroby odzwierzęce powodowane przez mikroorganizmy – bakterie i wirusy	6
1.1.2. Przyczyny przełamywania bariery międzygatunkowej	7
1.1.3. Przeszkody w uzyskaniu zdolności zakażenia człowieka	8
1.1.4. Etapy nabywania zdolności patogennych względem nowego gospodarza	9
1.1.5. Patogeny zwierzęce, które stają się nowymi patogenami człowieka	11
1.2. Gatunki ziarenkowców gramdodatnich stanowiące przedmiot badań.	14
1.2.1. Gatunki o potencjale zoonotycznym z rodzaju <i>Streptococcus</i>	14
1.2.1.1. <i>Streptococcus dysgalactiae</i>	14
1.2.1.2. <i>Streptococcus uberis</i>	16
1.2.1.3. <i>Streptococcus parauberis</i>	16
1.2.1.4. <i>Streptococcus gallolyticus</i>	17
1.2.2. Potencjał zoonotyczny <i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	18
1.3. Patogeneza zakażeń i czynniki chorobotwórczości ziarenkowców z rodzajów <i>Streptococcus</i> i <i>Staphylococcus</i> stanowiących przedmiot badań	19
1.3.1. Rodzaj <i>Streptococcus</i>	19
1.3.1.1. Wytwarzane przez paciorkowce substancje wpływające na proces adhezji i kolonizacji gospodarza i zapoczątkowujące ich inwazję	20
1.3.1.2. Hamowanie działania układu immunologicznego gospodarza i działanie toksyczne paciorkowców	23
1.3.2. Rodzaj <i>Staphylococcus</i>	25
1.3.2.1. Czynniki wpływające na proces kolonizacji tkanek przez <i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	25
1.3.2.2. Toksyny <i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	27

1.4. Lekowrażliwość ziarenkowców gramdodatnich stanowiących przedmiot tej pracy.....	28
1.4.1. Możliwości terapeutyczne w zakażeniach paciorkowcami.....	28
1.4.2. Możliwości terapeutyczne w zakażeniach <i>S. pseudintermedius</i> .	30
2. Założenia i cel pracy.....	32
3. Materiały.....	33
3.1. Rodzaj <i>Streptococcus</i>	33
3.1.1. Szczepy bakterii.....	33
3.1.2. Szczepy kontrolne wykorzystywane w trakcie badań.....	33
3.1.3. Warunki przechowywania szczepów.....	34
3.1.4. Podłoża mikrobiologiczne.....	34
3.1.4.1. Podłoża stosowane do namnażania szczepów.....	34
3.1.4.2. Podłoża stosowane w procesie identyfikacji szczepów bakterii z mleka krowiego.....	34
3.1.4.3. Podłoża stosowane do określania cech fenotypowych.....	34
3.1.5. Odczynniki, bufony oraz gotowe zestawy.....	35
3.1.5.1. Odczynniki do prób biochemicznych.....	35
3.1.5.2. Odczynniki do badania zdolności wyrastania szczepów w surowicy.....	36
3.1.5.3. Odczynniki do badania aktywności streptokinazy.....	36
3.1.5.4. Krążki antybiogramowe do oznaczania lekowrażliwości metodą dyfuzyjno-krążkową (Oxoid).....	36
3.1.5.5. Odczynniki do oznaczania zdolności tworzenia biofilmu.....	36
3.1.5.6. Odczynniki i materiały wykorzystane w badaniach genetycznych.....	37
3.1.6. Aparatura.....	38
3.1.7. Programy komputerowe.....	39
3.1.8. Usługi zleczone.....	39
3.2. Rodzaj <i>Staphylococcus</i>	39
3.2.1. Szczepy bakterii.....	39
3.2.2. Szczepy kontrolne wykorzystywane w trakcie badań.....	39
3.2.3. Warunki przechowywania szczepów.....	40
3.2.4. Podłoża mikrobiologiczne.....	40

3.2.4.1.	Podłoża stosowane do namnażania szczepów	40
3.2.4.2.	Podłoża stosowane do określania cech fenotypowych	40
3.2.4.3.	Podłoża do oznaczania lekowrażliwości.....	40
3.2.4.4.	Podłoża zastosowane do hodowli szczepów przed procedurą izolacji DNA i RNA	40
3.2.5.	Odczynniki, bufony oraz gotowe zestawy	41
3.2.5.1.	Odczynniki do prób biochemicznych	41
3.2.5.2.	Krażki i paski antybiogramowe do oznaczania lekowrażliwości metodą dyfuzyjno-krażkową (Oxoid).....	41
3.2.5.3.	Odczynniki i materiały wykorzystane w badaniach genetycznych.....	41
3.2.6.	Aparatura.....	42
3.2.7.	Programy komputerowe	43
4.	Metody	44
4.1.	Rodzaj <i>Streptococcus</i>	44
4.1.1.	Hodowla szczepów badanych.....	44
4.1.2.	Postępowanie identyfikacyjne	44
4.1.2.1.	Identyfikacja metodami fenotypowymi szczepów badanych wyizolowanych z mleka krów z zapaleniem wymion	44
4.1.2.2.	Identyfikacja genetyczna.....	45
4.1.3.	Analiza cech badanych szczepów metodami fenotypowymi	46
4.1.3.1.	Określanie typu hemolizy	46
4.1.3.2.	Określanie właściwości biochemicznych.....	46
4.1.3.3.	Określanie zdolności do tworzenia biofilmu.....	47
4.1.3.4.	Określanie zdolności szczepów do wyrastania w surowicy..	48
4.1.3.5.	Badanie aktywności streptokinazy wobec plazminogenu ludzkiego i bydłęcego	48
4.1.4.	Metody zastosowane w badaniach molekularnych.....	49
4.1.4.1.	Hodowla szczepów	49
4.1.4.2.	Izolacja kwasów nukleinowych.....	50
4.1.4.3.	Łańcuchowa reakcja polimerazy	50
4.1.4.4.	Łańcuchowa reakcja polimerazy w czasie rzeczywistym.....	54
4.1.4.5.	Elektroforeza w żelu agarozowym	55

4.1.5.	Określanie profilu lekowrażliwości metodą dyfuzyjno-krażkową.	55
4.2.	Rodzaj <i>Staphylococcus</i>	57
4.2.1.	Hodowla szczepów badanych.....	57
4.2.2.	Badanie cech badanych szczepów metodami fenotypowymi	57
4.2.2.1.	Określanie typu hemolizy	57
4.2.2.2.	Określanie właściwości biochemicznych.....	57
4.2.3.	Wykrywanie koagulazy oraz czynnika skupiania (Clumping Factor, CF)	58
4.2.3.1.	Wykrywanie koagulazy	58
4.2.3.2.	Wykrywanie czynnika skupiania (Clumping Factor, CF)	58
4.2.4.	Metody zastosowane w badaniach molekularnych.....	58
4.2.4.1.	Hodowla szczepów	58
4.2.4.2.	Izolacja DNA.....	58
4.2.4.3.	Łańcuchowa reakcja polimerazy	58
4.2.4.4.	Elektroforeza w żelu agarozowym	61
4.2.4.5.	Analiza i typowanie sekwencji multilocus (MLST).....	61
4.2.5.	Określanie profilu lekowrażliwości metodą dyfuzyjno-krażkową.	62
5.	Wyniki	63
5.1.	Rodzaj <i>Streptococcus</i>	63
5.1.1.	Identyfikacja badanych szczepów z rodzaju <i>Streptococcus</i>	63
5.1.1.1.	Identyfikacja bakterii w próbkach mleka krowiego	63
5.1.1.2.	Identyfikacja <i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i> oraz <i>S. gallolyticus</i>	66
5.1.2.	Zdolności kolonizacyjne szczepów badanych gatunków paciorkowców.....	67
5.1.2.1.	Zaspokajanie wymagań pokarmowych i niszczenie tkanek .	67
5.1.2.2.	Geny kodujące białka biorące udział w kolonizacji organizmu gospodarza.....	70
5.1.2.3.	Zdolność badanych szczepów do tworzenia biofilmu	72
5.1.3.	Inwazja i toksyczność	73
5.1.3.1.	Wyrastanie w surowicy.....	73

5.1.3.2.	Poszukiwanie genu streptokinazy oraz ocena jej aktywności wobec plazminogenu ludzkiego i bydlęcego	74
5.1.3.3.	Hamowanie aktywności układu immunologicznego gospodarza.....	76
5.1.3.4.	Geny toksynotwórczości	78
5.1.4.	Ocena ekspresji genów u wybranych szczepów	79
5.1.5.	Poszukiwanie szczepów przełamujących barierę międzygatunkową	80
5.1.6.	Lekooporność badanych szczepów paciorkowców	83
5.2.	Rodzaj <i>Staphylococcus</i>	87
5.2.1.	Zdolności kolonizacyjne szczepów badanych <i>S. pseudintermedius</i>	88
5.2.1.1.	Zdolność do niszczenia tkanek i wytwarzanie koagulazy	88
5.2.1.2.	Geny kodujące białka biorące udział w kolonizacji organizmu człowieka	89
5.2.2.	Inwazja i toksyczność	90
5.2.3.	Typowanie sekwencji multilocus	90
5.2.4.	Poszukiwanie szczepów przełamujących barierę międzygatunkową	93
5.2.5.	Lekooporność badanych szczepów <i>S. pseudintermedius</i>	93
6.	Dyskusja.....	95
6.1.	Identyfikacja badanych szczepów <i>S. dysgalactiae</i> i <i>S. uberis</i>	99
6.2.	Poszukiwanie cech istotnych dla patogenezы zakażeń badanymi paciorkowcami.....	100
6.3.	<i>S. gallolyticus</i> – nowy patogen człowieka.....	107
6.4.	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i> – patogen zwierząt i ludzi.....	108
6.5.	Zakażenia człowieka pochodzącymi od zwierząt szczepami paciorkowców i gronkowców - wyzwanie terapeutyczne.....	112
7.	Podsumowanie wyników	116
8.	Wnioski z przeprowadzonych badań	118
9.	Streszczenie	120
10.	Summary	123
11.	Piśmiennictwo	126
12.	Spis tabel	149

13.	Spis rycin.....	150
14.	Aneks	151
15.	Dorobek naukowy	187
15.1.	Publikacje będące podstawą pracy doktorskiej.....	187
15.2.	Pozostały dorobek naukowy	187
15.2.1.	Publikacje	187
15.2.2.	Doniesienia zjazdowe	187
16.	Oświadczenia współautorów.....	189

WYKAZ SKRÓTÓW

AIDS	– zespół nabytego niedoboru odporności, ang. <i>Acquired Immune Deficiency Syndrome</i>
ATCC	– Amerykańska Kolekcja Hodowli Komórkowych, ang. <i>The American Culture Collection</i>
BHI	– wyciąg mózgowo-sercowy, ang. <i>Brain Heart Infusion</i>
CAT	– acetylotransferazy chloramfenikolu, ang. <i>chloramphenicol acetyltransferase</i>
CF	– czynnik skupiania, ang. <i>Clumping Factor</i>
cMLSB	– konstytutywny mechanizm oporności na makrolidy, linkozamidy i streptograminy B, ang. <i>constitutive resistance to macrolide- lincosamide-streptogramin B antibiotics</i>
DNA	– kwas deoksyrybonukleinowy, ang. <i>deoxyribonucleic acid</i>
DSM	– Niemiecka Kolekcja Mikroorganizmów, ang. <i>German Collection of Microorganisms</i> , (niem. <i>Deutsche Sammlung von Mikroorganismen</i>)
ECM	– macierz pozakomórkowa, ang. <i>extracellular matrix</i>
EUCAST	– Europejski Komitet ds. Oznaczania Lekowrażliwości, ang. <i>The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
EXI	– toksyny eksfoliatywne, ang. <i>exfoliative toxin</i> ,
GAPDH	– dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego, ang. <i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
GAS	– paciorkowce grupy A wg Lancefield, ang. <i>Group A Streptococcus</i>
HIV	– ludzki wirus upośledzenia odporności, ang. <i>Human Immunodeficiency Virus</i>

iMLS _B	– indukcyjny mechanizm oporności na makrolidy, linkozamidy i streptograminy B, ang. <i>inductive resistance to macrolide-lincosamide-streptogramin B antibiotics</i>
IL-8	– interleukina 8, ang. <i>interleukin-8</i>
LL-37	– katelicydyna LL-37, ang. <i>cathelicidin LL-37</i>
MALDI TOF MS	– spektroskopia mas z laserową jonizacją próbki wspomaganą matrycą z detektorem czasu przelotu ang. <i>Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization – Time Of Flight Mass Spectrometry</i>
MALT	– chłoniak tkanki limfatycznej związanej z błoną śluzową ang. <i>Mucosa Associated Lymphoid Tissue Lymphoma</i>
MHC	– główny układ zgodności tkankowej, ang. <i>major histocompatibility complex</i>
MIC	– minimalne stężenie hamujące, ang. <i>Minimum Inhibitory Concentration</i>
MLS _B	– mechanizm oporności krzyżowej na makrolidy, linkozamidy i streptograminy B, ang. <i>resistance to macrolide, lincosamide and streptogramin B</i>
MLST	– typowanie sekwencji multilocus, ang. <i>Multi-Locus Sequence Typing</i>
MRSP	– oporny na metycylinę <i>Staphylococcus pseudintermedius</i> , ang. <i>methicillin-resistant Staphylococcus pseudintermedius</i>
MSSP	– wrażliwy na metycylinę <i>Staphylococcus pseudintermedius</i> , ang. <i>methicillin-susceptible Staphylococcus pseudintermedius</i>

MSCRAMM	–	komponenty powierzchni mikroorganizmów rozpoznające cząsteczki macierzy adhezyjnej, ang. <i>microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules</i>
NADaza	–	glikohydrolaza dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego,
NCTC	–	Narodowa Kolekcja Kultur Typowych (Wielka Brytania), ang. <i>National Collection of Type Cultures, a Culture Collection of Public Health England</i>
NET	–	neutrofilowe pułpaki zewnątrzkomórkowe, ang. <i>neutrophil extracellular traps</i>
PBP	–	białka wiążące penicylinę, ang. <i>penicillin-binding proteins</i>
PBS	–	buforowany fosforanem roztwór fizjologiczny soli, ang. <i>phosphate-buffered saline</i>
PCM	–	Polska Kolekcja Mikroorganizmów, ang. <i>The Polish Collection of Microorganisms</i>
PCR	–	łańcuchowa reakcja polimerazy, ang. <i>polymerase chain reaction</i>
PFGE	–	elektroforeza żelowa w polu pulsacyjnym, ang. <i>pulsed-field gel electrophoresis</i>
PIA	–	polisacharydowa adhezyna międzykomórkowa, ang. <i>polysaccharide intercellular adhesin</i>
PSM	–	moduliny rozpuszczalne w fenolu, ang. <i>phenol soluble modulins</i>
PVL	–	leukocydyna Panton-Valentine, ang. <i>Panton-Valentine leukocidin</i>
PYR	–	peptydaza pirolidonylowa, ang. <i>pyrrolidonyl-aryl-amidase</i>
RNA	–	kwas rybonukleinowy, ang. <i>ribonucleic acid</i>

rRNA	–	rybosomalny kwas rybonukleinowy, ang. <i>ribosomal ribonucleic acid</i>
SARS-CoV-2	–	drugi koronawirus ciężkiego ostrego zespołu oddechowego, ang. <i>Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2</i>
SIET	–	toksyna eksfoliatywna wytwarzana przez <i>Staphylococcus intermedius</i> , ang. <i>S. intermedius exfoliative toxin</i>
SpeB	–	pirogenna egzotoksyna B ang. <i>streptococcal pyrogenic exotoxin B</i>
SBSEC	–	kompleks paciorkowców grupy Bovis/Equinus, ang. <i>Streptococcus bovis/Streptococcus equinus group</i>
SDSD	–	<i>Streptococcus dysgalactiae</i> subsp. <i>dysgalactiae</i>
SDSE	–	<i>Streptococcus dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>
SE	–	enterotoksyny gronkowcowe, ang. <i>staphylococcal enterotoxins</i>
SGSG	–	<i>Streptococcus gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>
SGSP	–	<i>Streptococcus gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i>
SIC	–	paciorkowcowy inhibitor dopełniacza, ang. <i>streptococcal inhibitor of complement</i>
SIG	–	grupa <i>Staphylococcus intermedius</i> , ang. <i>Staphylococcus Intermedius Group</i>
SLO	–	streptolizyna O, ang. <i>streptolysin O</i>
SLS	–	streptolizyna S, ang. <i>streptolysin S</i>
SU	–	<i>Streptococcus uberis</i>
SP	–	<i>Streptococcus parauberis</i>
ST	–	typ sekwencyjny, ang. <i>sequence type</i>
STSS	–	paciorkowcowy zespół wstrząsu toksycznego, ang. <i>streptococcal toxic shock syndrome</i>

TSB	– bulion tryptozowo-sojowy, ang. <i>tryptic soy broth</i>
TSST	– gronkowcowa toksyna wstrząsu septycznego, ang. <i>toxic shock staphylococcal toxin</i>
WZW	– wirusowe zapalenie wątroby
ZMF	– Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej i Diagnostyki Mikrobiologicznej

1. Wstęp

1.1. Nabywanie zdolności zakażenia gospodarza innego gatunku – przełamywanie bariery międzygatunkowej

1.1.1. Nowe choroby odzwierzęce powodowane przez mikroorganizmy – bakterie i wirusy

W ostatnich latach wiele uwagi przywiązuje się do nowych chorób przenoszonych od zwierząt, zoonoz. Zoonoza to choroba wywołana przez bakterie, wirusy lub pasożyty, które w naturalnych warunkach przenoszą się pomiędzy zwierzętami kręgowymi a człowiekiem (Cockburn et al., 1959). Wśród chorób tak określanych wyróżnia się antropozoonozy - przenoszone przez zwierzęta na ludzi, np. wścieklizna, zooantropozony - przenoszone przez ludzi na zwierzęta, np. gruźlica ssaków takich jak koty i małpy, amfizoony - przenoszone w obu kierunkach, np. infekcje bakteriami z rodzaju *Staphylococcus* oraz euzoonozy, w których człowiek jest obowiązkowym żywicielem, np. w chorobach pasożytniczych *Taenia solium* (Rahman et al., 2020).

Bezpośrednia ekspozycja człowieka na patogeny dotąd tylko zwierzęce zwykle ogranicza się do wystąpienia łagodnych infekcji. W niektórych jednak, rzadkich przypadkach, takie przeniesienie patogenu może powodować znacznie poważniejsze konsekwencje i stać się zagrożeniem zdrowia publicznego (Devaux et al., 2019). Warto pamiętać jednak, że większość drobnoustrojów będących czynnikami etiologicznymi zakażeń ludzi pochodzi pierwotnie od zwierząt. Mikroorganizmy te stanowią blisko 60% wszystkich znanych patogenów człowieka (Gortazar et al., 2014; Rahman et al., 2020), a obserwuje się coraz częstsze pojawianie się nowych. Spośród blisko 1399 dotąd opisanych, aż 87 pojawiło się po raz pierwszy u ludzi po roku 1980 (Woolhouse & Gaunt, 2007). Każdego roku wykrywa się na świecie cztery nowe gatunki zagrażające ludziom (Gortazar et al., 2014; Rahman et al., 2020). Pojawiają się one na styku różnych ekosystemów: ludzi i zwierząt w ich bliskim otoczeniu oraz dzikiej przyrody (Devaux et al., 2019). Rezerwuarem nowych patogenów człowieka są najczęściej ssaki. Wśród ssaków podkreśla się rolę kopytnych, gryzoni, nietoperzy oraz naczelnych innych niż człowiek. Rzadziej przenoszone są one na człowieka z ptaków lub za ich pośrednictwem. Za przyczynę przełamywania bariery międzygatunkowej najczęściej uważa się zmienność drobnoustrojów – ich czynników wirulencji, antygenowości, specyficzności wobec żywiciela i profilu oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe (Woolhouse & Gaunt, 2007).

Proces przełamywania bariery międzygatunkowej dotyczy zarówno wirusów, u których zachodzi zdecydowanie szybciej, jak i bakterii (Devaux et al., 2019). Szybkie poszerzenie zakresu wrażliwych gospodarzy zaobserwowano w przypadku wirusa kociej leukopenii, który w ciągu kilku lat znalazł nowego gospodarza - psa. Psi parwowirus powstały z wirusa kociej leukopenii rozprzestrzenił się na populacje psów na całym świecie, wykazał duży potencjał adaptacyjny (Woolhouse & Gaunt, 2007).

Drobnoustroje, które mają zdolność zakażenia wielu gospodarzy, mogą z większym prawdopodobieństwem pojawić się w populacji ludzkiej (Rabaa et al., 2015). Większość patogenów wirusowych stanowią wirusy RNA. Wirusy te mają liczniejszych żywicieli w porównaniu z wirusami DNA i charakteryzuje je większa zmienność genetyczna. Nawet szczepy tego samego gatunku mogą różnić się zakresem wrażliwych gospodarzy jak np. podtypy wirusa grypy. Jeśli takie wirusy mają cechy dużej zjadliwości, są przyczyną zakażeń o wysokiej śmiertelności. Jako przykłady można podać m. in. wirusy Ebola, HIV (ludzki wirus niedoboru odporności, ang. *Human Immunodeficiency Virus*) czy hantawirusy. Od czasu pojawienia się wirusów takich jak *Influenza virus*, HIV czy SARS-CoV-2 (wirus ciężkiego ostrego zespołu oddechowego, ang. *Severe Acute Respiratory Virus 2*) nie ulega wątpliwości, że wirusy, które były pierwotnie tylko zwierzęce, po przeniesieniu na człowieka są w stanie, już bez zwierzęcego pośrednika, rozprzestrzeniać się między ludźmi i wywoływać ogólnoswiatowe epidemie. Wśród wirusów zwierzęcych, które z dużym prawdopodobieństwem też mogą zdobyć taką cechę, wymienia się wirusy wścieklizny, Ebola czy żółtej febry (Woolhouse & Gaunt, 2007).

Jednym z elementów prowadzących do przełamania bariery międzygatunkowej przez drobnoustroje jest dywergencja sekwencji genomowej znacznie częściej skutecznie zachodząca u wirusów. Za większą stabilność genomów bakteryjnych odpowiadają m. in. enzymatyczne mechanizmy naprawy DNA oraz system reparacji SOS. Enzymy naprawiające działają jako silne inhibitory rekombinacji międzygatunkowej, system SOS natomiast stanowi system kontrolujący indukowanie zmian genomu i zmienność genetyczną. Systemy te umożliwiają hamowanie tempa zmian sekwencji oraz określanie zakresu izolacji genetycznej (Matic, 1995). Na procesy te ma także znaczący wpływ presja selekcyjna środowiska. Opisywana jest zróżnicowana odpowiedź immunologiczna na ten sam patogen u ludzi mieszkających na różnych kontynentach, jak w przypadku *Listeria* sp. czy *Salmonella* sp. Ten sam patogen, w zależności od środowiska geograficznego, z którego pochodzi, może mieć różną zdolność kolonizowania i powodowania infekcji (Devaux et al., 2019).

1.1.2. Przyczyny przełamania bariery międzygatunkowej

Pierwsze opisywane przypadki izolacji nowych patogenów człowieka najczęściej dotyczą osób mających bliski kontakt ze zwierzętami. Badania selekcji genetycznej wskazują na to, że największym zagrożeniem są drobnoustroje zasiedlające dzikie zwierzęta. Jednak przenikanie i zacieranie się granic ekosystemów prowadzi do pojawiania się nowych patogenów zwierzęcych także wśród zwierząt gospodarskich (Devaux et al., 2019). Istotną rolę w przemianach i ekspansji tych drobnoustrojów odgrywa także wykorzystywanie egzotycznych gatunków zwierząt jako pożywienia (Rahman et al., 2020; Woolhouse & Gaunt, 2007).

Przeniesieniu patogenów zwierzęcych na nowego gospodarza, jakim jest człowiek, sprzyjają kontakty między ludźmi a zwierzętami, wspólne środowisko życia

lub bliski kontakt ze zwierzęcymi produktami. Znaczna gęstość zaludnienia oraz liczna obecność rezerwuarów i wektorów zwierzęcych na niewielkim obszarze geograficznym sprzyjają przeniesieniu zwierzęcych drobnoustrojów na nowego gospodarza (Gortazar et al., 2014). Istotne znaczenie dla pojawienia się nowych patogenów ludzi mają zaopatrzenie w wodę i warunki sanitarne siedlisk ludzkich (Woolhouse & Gaunt, 2007). Duży wpływ na to zjawisko ma niszczenie naturalnych ekosystemów, w których żyją zwierzęta. Powoduje je wynikające ze zmian klimatu pustynnienie czy też powszechne zanieczyszczanie środowiska. Wśród ważnych czynników sprzyjających przełamaniu bariery międzygatunkowej jest globalizacja. Intensywne rolnictwo, urbanizacja, migracje zarówno ludzi jak i zwierząt są wymieniane wśród istotnych przyczyn tego procesu (Devaux et al., 2019). Regionem wysokiego ryzyka pojawiania się nowych chorób odzwierzęcych jest Azja Południowo-Wschodnia. Duże zagęszczenie populacji ludzkiej i zwierząt gospodarskich, społeczne oraz kulturowe zachowania stanowią czynniki sprzyjające takim zakażeniom. Przykładem patogenu, który przełamał barierę międzygatunkową, wywodzącym się z tego regionu jest *Streptococcus suis* (Rabaa et al., 2015).

W ocenie tych zagrożeń zwraca się uwagę, że badania monitorujące etapy przemian drobnoustrojów przełamujących barierę międzygatunkową wywodzących się z mikrobioty zwierząt towarzyszących jak i gospodarskich mogą umożliwiać ocenę ryzyka ich trwałego przeniesienia na człowieka. Zwraca się uwagę również na wzrost lekooporności drobnoustrojów przenoszonych pomiędzy zwierzętami gospodarskimi, zwierzętami towarzyszącymi, ich właścicielami i personelem weterynaryjnym (Bhat, 2021). Nadzór i kontrola pojawiających się nowych patogenów człowieka ma również znaczenie dla uniknięcia potencjalnych zaburzeń gospodarczych (Blancou et al., 2005). Jak pokazuje przykład pandemii spowodowanej wirusem SARS-CoV-2, wysiłki związane z badaniami epidemiologicznymi i nadzór nad nowymi patogenami są ważne dla odniesienia sukcesu (Woolhouse & Gaunt, 2007). Należy jednak pamiętać, że lista patogenów zwierzęcych mających potencjał zakażenia człowieka pozostaje ciągle otwarta i nie jest możliwe przewidzenie wystąpienia każdej choroby spowodowanej przez nowy patogen lub ocena jej ciężkości (Rabaa et al., 2015).

1.1.3. Przeszkody w uzyskaniu zdolności zakażenia człowieka

Barierę w nabywaniu zdolności zakażenia nowego gospodarza stanowi niepodważalnie bariera biologiczna obejmująca m. in. budowę tkanek, metabolizm czy fizjologię występująca między wyższymi jednostkami taksonomicznymi organizmów. Człowiek nie współdzieli patogenów z roślinami. Niewiele też jest drobnoustrojów chorobotwórczych wspólnych dla człowieka i bezkręgowców czy kręgowców zmiennocieplnych. Zjawisko poszerzania grona gospodarzy przez drobnoustroje dotyczy organizmów bliżej spokrewnionych, jak się wydaje, głównie zwierząt kręgowych, ale i tak wymaga pokonania wielu barier i ograniczeń (Woolhouse & Gaunt, 2007). Proces przełamania bariery międzygatunkowej uwzględnia charakter i stopień narażenia człowieka na patogen zwierzęcy, pokonanie

jego bariery immunologicznej, w tym zdolności drobnoustroju do produktywnego infekowania i hamowania odpowiedzi immunologicznej oraz zdolności do skutecznego przenoszenia się patogenu pomiędzy ludźmi. Osiągnięcie wszystkich tych celów może doprowadzić do powstawania ognisk epidemicznych oraz pandemii. Patogeny przełamujące wszystkie te bariery stanowią zagrożenie dla zdrowia publicznego ze względu na ryzyko stałego występowania w populacji ludzkiej (Gortazar et al., 2014).

1.1.4. Etapy nabywania zdolności patogennych względem nowego gospodarza

Wskazana na początku rozdziału 1.1.1. powszechnie uznana klasyfikacja zoonoz nie odzwierciedla złożoności relacji zwierzęcych patogenów z człowiekiem. Relacje te nie pozwalają bowiem na używanie bardzo niejednoznacznego w tym kontekście określenia - ludzki patogen odzwierzęcy. W naturze występuje szereg szczepów o różnych właściwościach oraz etapów w tych relacjach, do rozpoznania których ma się przyczynić i ta praca doktorska.

Do przeniesienia, transmisji patogenu zwierzęcego do organizmu ludzkiego dochodzi bądź drogą kropelkową, czy w wyniku kontaktu ze skórą zwierzęcia, ale też drogą pokarmową, przez ugryzienie, zadrapanie lub przy udziale wektorów, najczęściej stawonogów (Devaux et al., 2019). Zagrożeniem, szczególnie dla osób związanych z hodowlą i przetwórstwem spożywczym jest, obok bezpośredniego kontaktu, zanieczyszczona patogenami pasza i mięso. Osoby takie mogą stać się nosicielami nowych patogenów i stanowić źródło ich rozprzestrzeniania. Rezerwuarem bakterii stanowiących zagrożenie jako nowe patogeny człowieka mogą być również gleba i woda zanieczyszczone odchodami zwierząt (Cantas & Suer, 2014).

Wolfe i wsp. (Wolfe et al., 2007) wyróżnili pięć poziomów przemian prowadzących do przekształcenia się patogenów typowo zwierzęcych w patogeny zakaźające wyłącznie ludzi. Można znaleźć i wskazać drobnoustroje znajdujące się na każdym z tych etapów.

Pierwszy poziom to patogeny zwierzęce powodujące infekcje i rozprzestrzeniające się wyłącznie wśród zwierząt. Wyklucza się możliwość przeniesienia patogenu na człowieka. Prawdopodobieństwo zakażenia człowieka przez patogen typowo zwierzęcy i przejścia na kolejny poziom zwiększa się jednak wraz ze wzrostem liczebności populacji oraz bliskością filogenetyczną zwierzęcia i człowieka. Choroby takie jak zespół nabytego niedoboru odporności (AIDS, ang. *Acquired Immune Deficiency Syndrome*) i wirusowe zapalenie wątroby typu B (WZW B) zostały przeniesione na człowieka najprawdopodobniej przez szympanasy lub goryle, mimo rzadkich spotkań z człowiekiem i małej liczebności populacji tych naczelników. Dużą rolę odegrała bliskość filogenetyczna. Gryzonie, w przeciwieństwie do szympanasów i goryli, nie mają bliskiego pokrewieństwa filogenetycznego

z człowiekiem, a mimo to przeniosły na człowieka choroby takie jak dżuma i dur plamisty, najprawdopodobniej dzięki dużej liczebności ich populacji i bliskim, częstym kontaktem z ludźmi. Na drugim etapie przemian znajdują się patogeny, które zakażają zwierzęta. Mogą przenieść się na człowieka i również u niego spowodować poważną chorobę. Nie ma jednak ich transmisji między ludźmi. Przykładami takich patogenów są wirusy takie jak wścieklizny, Nipah i Zachodniego Nilu (Wolfe et al., 2007). Wśród bakterii to m.in. *Bacillus anthracis*, *Francisella tularensis*, *Boreliella burgdorferi*, *Streptococcus iniae*, *Mycobacterium marinum* czy *Lactococcus garvieae*. Badania wskazują na to, że nowy żywiciel nie ma wielkiego wpływu na dalsze przekształcanie się tych patogenów w ludzkie (Rahman et al., 2020; Wolfe et al., 2007; Woolhouse & Gaunt, 2007). Proces dalszej przemiany drobnoustrojów tej grupy jest hamowany, np. przez ograniczenie infekcji w obrębie jednego układu (*Clostridium tetani*) lub z powodu sposobu przenoszenia związanego z zachowaniem zwierząt (np. ugryzienia). To uniemożliwia bezpośrednie rozprzestrzenianie patogenów (Wolfe et al., 2007).

Patogeny znajdujące się na trzecim poziomie przemian prowadzących do opanowania nowego gospodarza to patogeny zdolne do powodowania infekcji zarówno u zwierząt jak i u ludzi. Transmisja tych drobnoustrojów może zachodzić między ludźmi, ale jej łańcuch jest krótki i obejmuje tylko kilka cykli przeniesienia. Może to jednak prowadzić do powstawania niewielkich ognisk epidemicznych. Epidemie wyczerpują się w krótkim czasie, jeśli zakażony odzyskuje zdrowie i nabywa odporność lub gdy szybko umiera. W małej populacji dochodzi do wyczerpania możliwości przenoszenia czynnika etiologicznego, gdy nie ma już podatnych nowych gospodarzy. W przypadku dużego zagęszczenia populacji ludzkiej dochodzić może jednak do rozszerzenia pierwotnego obszaru. Przykładami patogenów będących na tym etapie drabiny ewolucyjnej są hantawirusy, torowirusy, wirusy ptasiej grypy (Wolfe et al., 2007; Woolhouse & Gaunt, 2007). Wśród bakterii są to pałeczki z rodzaju *Brucella*, które najczęściej infekują poprzez skażone mleko. Przenoszenie infekcji z człowieka na człowieka nadal jest jednak rzadkością (Rahman et al., 2020). Dla różnych drobnoustrojów, przejście granicy między etapami trzecim i czwartym może wymagać różnego czasu. Jest zależne od wielkości narażonej populacji ludzkiej, jej zagęszczenia oraz wydajności przenoszenia patogenu. Jest ona uzyskiwana przez nabycie lub wyższą ekspresję cech sprzyjających kolonizacji i inwazji nowego gospodarza.

Patogeny znajdujące się na etapie czwartym są od dawna obecne jako czynniki etiologiczne infekcji ludzkich. Przenoszą się one z łatwością wielokrotnie między ludźmi (Woolhouse & Gaunt, 2007). Czwarty poziom obejmuje różne rodzaje zależności. Pierwszy, gdy częstość przenoszenia patogenu ze zwierzęcia na człowieka przeważa nad bezpośrednią transmisją między ludźmi. Drugi to sytuacja, w której przenoszenie między zwierzęciem a człowiekiem i człowiekiem a człowiekiem jest równie częste. Wreszcie trzecia sytuacja, gdy przenoszenie występuje znacznie

częściej między ludźmi a nie między zwierzęciem a człowiekiem (Wolfe et al., 2007). Wykazano, że transmisja patogenu może w takim przypadku być również pośrednia, poprzez zanieczyszczenie żywności czy poprzez wektor (Woolhouse & Gaunt, 2007).

Etap piąty ewolucji osiągnęły patogeny, które stały się patogenami wyłącznie ludzkimi, już nie izolowanymi od zwierząt. Przykładów takich patogenów jest wiele zarówno w świecie wirusów (m. in. wirus odry, świnki, różyczki, ospy, WZW typu B, HIV) jak i w świecie bakterii (*Bordetella pertussis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Treponema pallidum*) (Wolfe et al., 2007).

Na każdym etapie przedstawionej drabiny ewolucyjnej przeważają patogeny stałocieplnych kręgowców – ssaków oraz rzadziej ptaków. Wskazuje to na istotność bliskości filogenetycznej gospodarzy, względem których dochodzi do przełamania bariery międzygatunkowej. Warto zaznaczyć również, że zwierzęta naczelne, które stanowią 0,5% wszystkich gatunków kręgowców, były pierwotnymi gospodarzami patogenów, które powodują 20% chorób występujących u ludzi. Bariera między naczelnymi a człowiekiem jest najsłabsza, ale kontakt jest niewielki, gdyż większość z tych zwierząt zamieszkuje strefy tropikalne. Większość chorób strefy umiarkowanej pochodzi natomiast od zwierząt domowych i gospodarskich. Podkreśla to rolę bariery geograficznej w przypadku pokonywania kolejnych etapów drabiny ewolucyjnej (Wolfe et al., 2007).

1.1.5. Patogeny zwierzęce, które stają się nowymi patogenami człowieka

W ostatnich latach opisano wiele nowych gatunków bakterii, które obecne u zwierząt jako mikrobiota lub patogeny ujawniły jednocześnie zdolność spowodowania zakażenia u człowieka. Wśród gatunków bakterii, które są na etapie przełamania bariery międzygatunkowej, są zarówno bakterie gramujemne jak i gramododatnie.

Do zakażenia zwierzęcymi gatunkami *Helicobacter* dochodzi poprzez bezpośrednie kontakty ze zwierzętami domowymi lub poprzez spożycie produktów zwierzęcych, w tym najczęściej surowego wieprzowego mięsa (van der Mee-Marquet et al., 2017). W rodzaju *Helicobacter* opisano nowe zakażenia odzwierzęce szczepami należącymi do trzech gatunków (Blaecher et al., 2017; Javed et al., 2017; van der Mee-Marquet et al., 2017). Pierwszy z nich, *Helicobacter caesarodunensis*, to gatunek zbliżony do *H. equorum*. Opisano szczep tego gatunku, który spowodował u człowieka zakażenie krwi (van der Mee-Marquet et al., 2017). Nowym zwierzęcym gatunkiem rodzaju *Helicobacter* atakującym człowieka jest *H. pullorum*, stanowiący mikrobiotę przewodu pokarmowego ptaków (kurczaków, indyków, perliczek), szczurów czy królików. U człowieka zakażenia tym gatunkiem prowadzą do rozwoju infekcji jelitowych. Opisano również przypadek bakteriemii u pacjenta z dolegliwościami ze strony układu pokarmowego w postaci bólu brzucha i obfitej biegunki. Zakażenia dotyczyły zarówno osób immunokompetentnych jak i immunoniekompetentnych.

Zaobserwowano, że wśród *Helicobacter* izolowanych od pacjentów cierpiących z powodu choroby Leśniowskiego-Crohna dominuje *H. pullorum* (Javed et al., 2017). *H. suis*, którego głównym rezerwuarem są świnie, jest przenoszony na człowieka przez bezpośredni lub pośredni kontakt z tymi zwierzętami. Źródło infekcji może również stanowić surowe i niedogotowane mięso wieprzowe. Wykazywano obecność tego gatunku w przewodzie pokarmowym pacjentów z zapaleniem i owrzodzeniami błony śluzowej żołądka i dwunastnicy (Blaecher et al., 2017; Joosten et al., 2013). Występowanie tego patogenu u człowieka powiązано jednocześnie z wyższym ryzykiem rozwoju chłoniaka typu MALT (chłoniak tkanki limfatycznej związanej z błoną śluzową, ang. *Mucosa Associated Lymphoid Tissue Lymphoma*) (Blaecher et al., 2017).

Zakażenia ludzi powoduje także gramujemny *Campylobacter fetus*, który stanowi naturalną mikrobiotę przewodu pokarmowego bydła oraz gadów, ale może też powodować kampylobakteriozy narządów płciowych bydła (*C. fetus* subsp. *venerealis*). *C. fetus* jest jednak rzadko zgłaszany jako przyczyna zakażeń u ludzi. Powoduje je przede wszystkim u osób z obniżoną odpornością, u ciężarnych i osób starszych. Z trzech podgatunków: *C. fetus* subsp. *fetus*, *C. fetus* subsp. *venerealis* oraz *C. fetus* subsp. *testudinum* większość zakażeń ludzi jest powodowana przez pierwszy podgatunek. Zgłaszano poważne infekcje, w tym bakteriemię i zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych. Opisanego dopiero niedawno *C. fetus* subsp. *testudinum* wyizolowano z kału gadów, żółwi, węży i jaszczurek. Zakażenia ludzi tym podgatunkiem dotyczą głównie osób pochodzenia azjatyckiego i najprawdopodobniej wynikają z ekspozycji na gady lub tradycyjne azjatyckie potrawy (Patrick et al., 2013).

Wśród bakteryjnych patogenów ryb wyróżnia się wiele gatunków charakteryzujących się możliwością zakażenia człowieka. Czynnikiem ryzyka jest spożywanie surowych owoców morza, surowych ryb oraz zawodowe narażenie związane z ich hodowlą i obróbką. Do zakażenia może dochodzić również w wyniku kontaktu uszkodzonej skóry ze skażoną wodą, w tym wodą akwariową. Jednym z nowych patogenów człowieka w tej grupie jest *Lactococcus garvieae*. Bakterie tego gatunku powodowały zapalenie wsierdza czy zapalenie pęcherzyka żółciowego. Jednak najpowszechniej zakażenia ludzi związane z akwakulturą powodowane są przez pochodzące od zwierząt szczepy mykobakterii, m.in. *Mycobacterium marinum*. U ludzi mogą one być przyczyną ziarniniakowego zapalenia skóry, ale i głębszych tkanek, prowadząc do zapalenia pochewki ścięgna, zapalenia kości czy szpiku. Przystosowanie tych prątków do organizmu człowieka hamuje jednak ich wrażliwość na graniczną temperaturę wzrostu, jaką jest dla nich 37°C (Gauthier, 2015).

Chlamydiozy spowodowane gatunkami zwierzęcymi zdarzają się u ludzi stosunkowo rzadko. Opisywanymi już od wielu lat czynnikami etiologicznymi tych zakażeń są *Chlamydia felis* czy *Chlamydia psittaci*. Jednak w ostatnim czasie opisano u człowieka *Chlamydia caviae*. Szczepy tego gatunku dotąd izolowane były jedynie z przypadków wtęretowego zapalenia spojówek świnek morskich (Filcek et al., 2019).

Zaniepokojenie budzi pojawienie się u ludzi poważnych niekiedy zakażeń *Bordetella hinzii*. Przypadki przeniesienia tego patogenu od zwierząt prowadziły do rozwoju różnorodnych infekcji: dróg oddechowych, dróg żółciowych, bakteriemii czy zapalenia wsierdza. Autorzy opisujący te przypadki uznają je za bardzo niepokojące, ponieważ pałeczki *Bordetella* są już mocno ustabilizowanymi patogenami człowieka, łatwo przenoszonymi się między ludźmi, stąd zagrożenie tym nowym patogenem jest znaczące (Launay et al., 2021).

Szczególnie liczne przykłady gatunków, które są na różnych etapach przełamania bariery międzygatunkowej i uzyskiwania zdolności zakażenia człowieka można znaleźć wśród ziarenkowców gramdodatnich.

W rodzaju *Staphylococcus* są to przede wszystkim *S. intermedius* i *S. pseudintermedius* (Pena et al., 2016). Należą one, obok *S. delphini* oraz *S. cornubiensis*, do wydzielonej w oparciu o sekwencjonowanie genu 16S rRNA grupy taksonomicznej SIG (grupa *Staphylococcus intermedius*, ang. *Staphylococcus intermedius group*) (Bhooshan et al., 2020; Murray et al., 2018). Gatunek *S. intermedius* stanowi mikrobiotę psiej skóry i pyska. W wyniku przeniesienia tego patogenu na człowieka poprzez ugryzienie dochodziło do rozwoju bakteriemii, zapalenia płuc, zapalenia stawów czy zmian skórnych (Pena et al., 2016). Gatunki *S. pseudintermedius* i *S. delphini* są komensalami zwierząt, a jako patogeny oportunistyczne mogą powodować infekcje skóry, ran i tkanek miękkich u zwierząt. Nawet 90% zdrowych psów może być skolonizowanych przez *S. pseudintermedius*. Zakażenia tym gatunkiem ludzi prowadzą najczęściej do infekcji skóry, ran i tkanek miękkich, ale mogą występować także infekcje inwazyjne - zapalenie wsierdza czy protez stawów (Bhooshan et al., 2020; Somayaji et al., 2016). W 2019 r. przedstawiono pierwszy przypadek infekcji człowieka spowodowanej przez *S. delphini*, gatunek występujący zwykle u koni, gołębi i łasicowatych (Magleby et al., 2019). W 2018 r. Murray i wsp. (Murray et al., 2018) opisali pierwszy przypadek infekcji człowieka spowodowanej przez *S. cornubiensis*, gatunek blisko spokrewniony z *S. intermedius*. Pojedyncze izolacje u ludzi dotyczą również *S. kloosii*, który jest znanym patogenem zwierzęcym, głównie krów i kóz (Cuny et al., 2017).

W rodzaju *Streptococcus* jest wiele gatunków, które, jak się wydaje, poszerzają zakres wrażliwych gospodarzy (Baracco, 2019; Turner et al., 2019). W jego obrębie występują gatunki zwierzęce ulokowane na różnych poziomach drabiny ewolucyjnej. Jednym z gatunków paciorkowców jest *S. pyogenes*, uznany typowy patogen człowieka. Patogenem zwierząt jest natomiast *Streptococcus suis*. Jednak gatunek ten powoduje groźne odzwierzęce infekcje a nawet epidemie wśród ludzi. Chociaż nie stwierdzono przenoszenia jego szczepów między ludźmi, znaleziono je u nosicieli (Hlebowicz et al., 2019). Szczepy tego gatunku charakteryzują się dużą zmiennością struktury genowej, ale także różnorodną budową serotypu polisacharydu otoczkowego, na podstawie którego wydzielane są serotypy (Zhao et al., 2019). Jako „nowe wschodzące ludzkie patogeny” określa się kolejne gatunki paciorkowców.

Opisano, nieliczne jak dotąd, przypadki infekcji spowodowane przez *S. iniae*. Niepokój budzą także zakażenia wśród ludzi powszechnie izolowanym z zakażeń bydła *S. uberis*, gatunkiem badanym w tej pracy (El Aamri et al., 2015; Eryildiz et al., 2017). Także szczepy podgatunków *S. equi* powodują pojedyncze zakażenia u ludzi. Opisano takie przypadki u pacjentów immunoniekompetentnych spowodowane przez szczepy *S. equi* subsp. *ruminatorum* (Marchandin et al., 2007; Meyer et al., 2011), a także zakażenia *S. equi* subsp. *equi* (Torpiano et al., 2020; Wasniewska-Włodarczyk et al., 2022). Infekcje spowodowane przez te dwa podgatunki były sporadyczne, ale w przypadku *S. equi* subsp. *zooepidemicus* opisano już kilkadziesiąt infekcji ludzi, które rozwinęły się w wyniku bezpośredniego kontaktu z końmi lub spożycia skażonych produktów spożywczych (Kutsukutsa et al., 2019).

Wśród gatunków paciorkowców grupy SBSEC (kompleks paciorkowców grupy Bovis/Equinus, ang. *Streptococcus bovis/Streptococcus equinus* group) stanowiących komensale przewodu pokarmowego różnych zwierząt wskazywane są takie, których obecność w przewodzie pokarmowym człowieka wiązana jest z większym ryzykiem rozwoju nowotworów przewodu pokarmowego, m.in. dróg żółciowych czy jelita grubego. Przykładem takiego gatunku jest *Streptococcus gallolyticus* (Kaindi et al., 2018; Lin et al., 2019), będący gatunkiem badanym w tej pracy.

Paciorkowcem uznanym za gatunek o najszerszym zakresie żywicieli jest *S. canis*. Głównymi jego gospodarzami są psy i koty, z których infekcje przenoszą się na ludzi (Pagnossin et al., 2022).

Szczególą uwagę badaczy zwraca w ostatnim czasie *Streptococcus dysgalactiae*. Jego szczepy mają już zdolność przenoszenia się nie tylko między zwierzętami i zwierzętami a człowiekiem, ale także między człowiekiem a człowiekiem (Takahashi et al., 2017). Oba podgatunki *Streptococcus dysgalactiae*, *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* oraz *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae*, są przedmiotem badań tej pracy i zostaną omówione w dalszej jej części.

1.2. Gatunki ziarenkowców gramdodatnich stanowiące przedmiot badań

Wśród bakterii zwierzęcych o różnym stopniu potencjału patogenego względem ludzi w ramach niniejszej rozprawy analizowano cechy gatunków z rodzaju *Streptococcus*: *S. dysgalactiae*, *S. uberis*, *S. parauberis*, *S. gallolyticus* oraz *Staphylococcus pseudintermedius*.

1.2.1. Gatunki o potencjale zoonotycznym z rodzaju *Streptococcus*

1.2.1.1. *Streptococcus dysgalactiae*

W obrębie gatunku *Streptococcus dysgalactiae* wyróżniane są dwa podgatunki – *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* (SDSE) oraz *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae*

(SDSD). Ze względu na budowę wielocukru C w ścianie komórkowej, szczepy podgatunku SDSE zaliczają się najczęściej do grup C i G, dużo rzadziej A i L według Lancefield. Szczepy podgatunku SDSD to najczęściej grupa serologiczna C (Babbar et al., 2018; Baracco, 2019; Vieira et al., 1998). Paciorkowce tego gatunku należą do grupy filogenetycznej Pyogenic (Gao et al., 2014). Wśród szczepów *S. dysgalactiae* wyróżnia się α -hemolizujące i β -hemolizujące. Wprawdzie rodzaj powodowanej hemolizy wskazuje się jako element umożliwiający przyporządkowanie do podgatunku, jednak metoda ta może nie być wiarygodna (Koh et al., 2020). Poprawną identyfikację można przeprowadzić z użyciem kilku metod molekularnych np. przez sekwencjonowanie genu 16S rRNA, *sodA*, *tuf*, *rpoB* i *recA*. Sekwencjonowanie genu 16S rRNA wydaje się jednak metodą o najwyższym potencjale identyfikacyjnym (Kosecka-Strojek et al., 2020).

Paciorkowce *S. dysgalactiae* mogą wchodzić w skład mikrobioty zwierząt jak i ludzi (Acke et al., 2015; Jordal et al., 2015; Yung et al., 2019). Podgatunek SDSD uznaje się za czynnik etiologiczny takich zakażeń zwierząt jak bydłęce zapalenie sutka, zespół wstrząsu toksycznego u bydła, zapalenie wielostawowe u jagniąt, bakteriemia u psów (Rato et al., 2011). Wśród nietoperzy, które uznaje się za zwierzęta o wysokim potencjale rozprzestrzeniania patogenów, opisywano zapalenie mózgu, płuc czy posocnicę (Mioni et al., 2018). Zakażenia ludzi, w których czynnikiem etiologicznym były paciorkowce SDSD nie są częste, opisano zapalenie tkanki łącznej, bakteriemię, infekcyjne zapalenie wsierdzia, a w opisie każdego z nich przedstawiono wiarygodny sposób identyfikacji genetycznej (Chennapragada et al., 2018; Jordal et al., 2015; Koh et al., 2009).

Paciorkowce podgatunku SDSE także wchodzi w skład mikrobioty zwierząt i zdrowych ludzi. Uważa się, że mogą one kolonizować żeńskie narządy płciowe, przewód pokarmowy, skórę i gardło. U zwierząt (np. świń, koni, psów i kotów) izolowane były m. in. z nosa, gardła, migdałków, skóry i narządów płciowych (Acke et al., 2015; Oh et al., 2018; Preziuso et al., 2010; Yung et al., 2019). Wang i wsp. wykazali, że szczepy powodujące infekcje u ludzi mają podobne zestawy czynników wirulencji jak szczepy występujące u nosicieli (Wang et al., 2016). Wykazano także, że SDSE wyizolowane od ludzi i zwierząt, z niepowiązanych epidemiologicznie źródeł, dysponują takimi samymi wzorami uzyskanymi metodą genotypowania PFGE (elektroforeza żelowa w polu pulsacyjnym, ang. *Pulsed Field Gel Electrophoresis*) (Silva et al., 2015). Szczepy tego podgatunku mogą przenosić się pomiędzy zwierzętami oraz między zwierzętami a ludźmi. Infekcje ludzi, których czynnikami etiologicznymi są SDSE uważa się za oportunistyczne (Baracco, 2019; Rodriguez-Munoz et al., 2019). Są to najczęściej infekcje skóry czy zapalenia migdałków, ale opisywano też przypadki ciężkiego martwiczego zapalenia powięzi, bakteriemii, infekcyjnego zapalenia wsierdzia, zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych, zespołu szoku toksycznego, zapalenia stawów, kości i szpiku, poporodowej posocnicy (Baracco, 2019; Rantala, 2014). Szczepy SDSE izolowane były także jako czynniki

etiologiczne zakażeń u zwierząt – u prosiąt były przyczyną rozsianej infekcji obejmującej kulawiznę, ropne zapalenie stawów, zapalenie mózgu oraz wieloogniskowe ropnie w nerkach i sercu, u źrebiąt – powodowały zakażenia układu oddechowego, u kóz zakażenia wielostawowe (Preziuso et al., 2010).

1.2.1.2. *Streptococcus uberis*

Paciorkowców identyfikowanych jako *Streptococcus uberis* nie udaje się zaklasyfikować ani do grupy serologicznej według Lancefield ani do grupy filogenetycznej. Gatunek ten jest problematyczny także ze względu na trudność identyfikacji metodami fenotypowymi. Wskazuje się przydatność oceny zdolności hydrolizy eskuliny, fermentacji inuliny, mannitolu i hydrolizy hipuranu sodu. Dla w pełni wiarygodnej identyfikacji zaleca się jednak zastosowanie metod genetycznych (Eryildiz et al., 2017).

Paciorkowce te uznawane są za bakterie środowiskowe, mogą znajdować się w odchodach zwierząt i ściółce, izolowano je również z miejsc przebywania zwierząt gospodarskich np. pastwisk (McDougall et al., 2020; Oliver et al., 2011). Wymienione miejsca bytowania tych mikroorganizmów, skażona woda oraz niewłaściwa higiena automatycznych systemów dojenia mogą być źródłami zakażenia u zwierząt (Eryildiz et al., 2017; Haenni et al., 2018; Luo et al., 2017; Werner et al., 2018). *S. uberis* mają zdolność kolonizowania organizmów zwierzęcych, najczęściej krów. Izolowano je m. in. ze zwacza, migdałków, narządów płciowych, w tym gruczołu sutkowego. Uznaje się je za jedną z głównych przyczyn zapalenia wymion u krów a także owiec, kóz i koni (Dore et al., 2016; Haenni et al., 2018; Meriglier et al., 2018). Pojedyncze przypadki dotyczyły poronień wśród bydła oraz infekcji u ryb (Di Blasio et al., 2019; Luo et al., 2017).

Paciorkowce identyfikowane jako *S. uberis* izolowano także z materiałów klinicznych od ludzi. Opisano do tej pory kilka przypadków infekcji, które obejmowały zapalenie wsierdzia, bakteriemię, zakażenie dolnych dróg oddechowych, zapalenie szpiku. W każdym przypadku stwierdzono kontakt chorego ze zwierzętami gospodarskimi (Eryildiz et al., 2017; Meriglier et al., 2018; Valentiny et al., 2015). Badania sugerują również, że *S. uberis* mogą być komensalami jamy ustnej człowieka, ich obecność stwierdzano po zabiegach przyzębia (Kessel & Wittenberg, 2008; Meriglier et al., 2018).

1.2.1.3. *Streptococcus parauberis*

Gatunek ten powstał w wyniku odłączenia jednego z genotypów *S. uberis*. Podobnie jak w przypadku *S. uberis* identyfikacja fenotypowa jest bardzo trudna. Wskazuje się jedynie na jedną różnicę między tymi dwoma gatunkami bakterii – w przeciwieństwie do *S. uberis* nie ma on zdolności wytwarzania β -D-glukuronidazy. W identyfikacji *S. parauberis* zalecane jest użycie metod molekularnych (Oliver et al.,

2011; Zhang et al., 2020). Gatunek ten uznawany jest za patogen ryb, zakażenia prowadzą u nich do przekrwienia wątroby, śledziony, nerek a także zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych, osierdzia i sepsy. Wymieniany jest też jako rzadka przyczyna zapalenia wymion (Kim et al., 2017; Torres-Corral & Santos, 2020). Infekcje ludzi są niezwykle rzadkie, najczęściej są to zakażenia ran po kontakcie z chorym zwierzęciem (Huan et al., 2020).

1.2.1.4. *Streptococcus gallolyticus*

Bakterie gatunku *Streptococcus gallolyticus* zaliczane są do filogenetycznej grupy Bovis paciorkowców i typują się jako grupa D według Lancefield. Należą do kompleksu SBSEC, czyli *Streptococcus bovis*/*Streptococcus equinus* complex, grupy niehemolizujących paciorkowców, których nomenklatura zmieniała się dynamicznie na przestrzeni ostatnich lat. Ze względu na dużą zmienność fenotypową gatunków należących do kompleksu SBSEC zaleca się stosowanie w identyfikacji metod molekularnych. W obrębie tego gatunku wyróżnia się trzy podgatunki: *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*, *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus* oraz *S. gallolyticus* subsp. *macedonicus* (Pompilio et al., 2019).

Paciorkowce podgatunku *S. gallolyticus* subsp. *macedonicus* izolowane są z mleka i fermentowanych produktów mlecznych i mają niewielki potencjał chorobotwórczy. Opisano tylko jeden przypadek infekcji *S. gallolyticus* subsp. *macedonicus* u człowieka (zapalenie wsierdzia), nie stwierdzono przypadków zakażeń u zwierząt (Malkin et al., 2008). Podgatunek *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus* ma szeroki zakres gospodarzy. Sugeruje się znaczny potencjał odzwierzęcy tych bakterii w kontaktach bezpośrednich i przenoszenie ich drogą fekalno-oralną. Szczepy izolowane z produktów spożywczych, od zwierząt i od ludzi są sobie bardzo bliskie filogenetycznie. Wśród zwierząt stanowią one komensale żwacza i jelit, gdzie wspomagają procesy trawienne, ale uznawane są też za ich patogeny oportunistyczne odpowiedzialne za zespół neurologiczny nowonarodzonych zwierząt, ropne zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych, zapalenie wsierdzia czy posocnicę (Trotta et al., 2019). Opisano także kilkadziesiąt przypadków poważnych zakażeń ludzi, których czynnikami etiologicznymi były szczepy z podgatunku *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus*. Patogen ten może być przyczyną infekcji noworodków – ciężkiej posocznicy oraz zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych. Infekcje noworodków związane są prawdopodobnie z nosicielstwem tych paciorkowców w pochwie kobiet oraz ich obecnością w mleku kobiecym. Pojedyncze przypadki dotyczyły zapaleń płuc oraz zapaleń wsierdzia. Wśród dorosłych odnotowano ponadto zapalenie kości, szpiku, otrzewnej oraz ropnie narządów litych przewodu pokarmowego. Często izolacja bakterii *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus* dotyczy również osób z cukrzycą i występujących u tych pacjentów infekcji dróg moczowych. Odnotowano także przypadki zakażeń dróg żółciowych. Bakterie tego podgatunku izolowano również w przypadkach nowotworów przewodu pokarmowego, żołądka, trzustki, wątroby,

jelita grubego oraz najczęściej dróg żółciowych (Li et al., 2019; Matsubara et al., 2015; Trotta et al., 2019). Wykazano różnice geograficzne w częstości izolacji *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus* i *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*. Pierwszy jest częstą przyczyną zapalenia wsierdza w krajach azjatyckich, a drugi częściej izolowany na terenie Europy (Trotta et al., 2019). Podgatunek *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* ma także znaczny potencjał przenoszenia od zwierząt. Zidentyfikowano te same typy sekwencyjne oraz te same objawy kliniczne zakażeń w organizmach ludzi i zwierząt. Przenoszenie tych paciorkowców odbywa się drogą kropelkową lub bezpośrednio z powierzchni zanieczyszczonych bakteriami. Szczególne znaczenie ma bliski bezpośredni kontakt. Żywność pochodzenia zwierzęcego także może być źródłem kolonizacji organizmu ludzkiego. Kolonizacja zwierząt dotyczy do 90% populacji, a u ludzi ok. 3-15%. Przyczynę rozwoju infekcji zarówno u ludzi jak i u zwierząt może stanowić translokacja bakterii z jelit. Przypadki zakażeń *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* dotyczą najczęściej małych zwierząt, u których obserwowano ropne zmiany narządowe, krwotoki w tętnicy płucnej i zastawce aorty, zapalenie wsierdza czy zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych. U ludzi patogeny te powodują zapalenia wsierdza lub bakteriemie, opisano także pojedyncze przypadki zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych (Aydin et al., 2019; Dumke et al., 2017; Rizzo et al., 2019). Jednak najbardziej znaczący wydaje się związek występowania bakterii *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* z rozwojem nowotworów jelita grubego, gruczolaków. U blisko 65% pacjentów z inwazyjnymi zakażeniami, gdzie czynnikiem etiologicznym były bakterie tego podgatunku, istniało wysokie ryzyko rozwoju nowotworu. Obecność w okrężnicy *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* była 10-krotnie wyższa u osób z chorobą nowotworową niż u osób zdrowych (Kumar et al., 2018; Lin et al., 2019). Badania wskazują, że występujące w komórkach *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* białko Gallo2178 ma znaczący wpływ na proces rozwoju nowotworu jelita grubego (Butt et al., 2018).

1.2.2. Potencjał zoonotyczny *Staphylococcus pseudintermedius*

W ostatnich latach pojawiły się nowe ważne patogeny człowieka z rodzaju *Staphylococcus*. Jednym z nich jest znany od dawna w medycynie weterynaryjnej zwierząt towarzyszących *Staphylococcus pseudintermedius*. Należy on do grupy SIG obejmującej trzy inne gatunki gronkowców – *S. intermedius*, *S. delphini*, *S. cornubiensis*, które związane są z różnymi gatunkami żywicieli – norkami, końmi, krowami czy gołębiami. Wszystkie trzy gatunki to bakterie koagulazododatnie (Ben Zakour et al., 2012). Wobec tego faktu zakażenia nimi mogą być fałszywie uznawane za infekcje *S. aureus*. Fenotypowe odróżnienie bakterii tej grupy od *S. aureus* możliwe jest z użyciem testu β -galaktozydazy oraz testu aktywności peptydazy pirolidonylowej (PYR, ang. *pyrrolidonyl-aryl-amidase*) (Magleby et al., 2019; Viau et al., 2015). Trudność diagnostyczną stanowi prawidłowa identyfikacja i odróżnienie gatunków *S. pseudintermedius* oraz *S. intermedius*, co możliwe jest dopiero z zastosowaniem badań molekularnych.

S. pseudintermedius kolonizują skórę i błony śluzowe zdrowych zwierząt, ale są też ich patogenami oportunistycznymi, powodując infekcje skóry, tkanek miękkich oraz zapalenia ucha zwłaszcza u psów, rzadziej wśród kotów (Aslantas et al., 2023). Szczepy komensalne mają zdolność ewoluowania w szczepy patogenne (Fabregas et al.). W badaniach wykazano również osiągającą kilka procent zdolność kolonizacji przez *S. pseudintermedius* organizmów ludzi (Cuny et al., 2022). Infekcje *S. pseudintermedius* u ludzi powstają najczęściej jako wynik ugryzienia lub przeniesienia patogenu ze skóry zwierzęcia na nowego gospodarza. W wyniku takiego zakażenia może dochodzić do rozwoju powierzchownych infekcji skóry, ale także zapalenia wsierdza, zapalenia płuc, septycznego zapalenia stawów czy bakteriemii. Uważa się także, że *S. pseudintermedius* może być czynnikiem etiologicznym zatruc pokarmowych ze względu na zdolność wytwarzania enterotoksyn (Ben Zakour et al., 2012; Viau et al., 2015).

W ostatnich latach nowymi ludzkimi patogenami, przeniesionymi z organizmów kotów i psów, stały się również koagulazododatnie *S. delphini* oraz *S. cornubiensis* (Magleby et al., 2019; Murray et al., 2018).

1.3. Patogeneza zakażeń i czynniki chorobotwórczości ziarenkowców z rodzajów *Streptococcus* i *Staphylococcus* stanowiących przedmiot badań

Wśród rodzaju *Streptococcus* i *Staphylococcus* jest wiele gatunków bakterii, których obserwacja pozwala przypuszczać, że mogą niebawem przełamać bariery ochronne nowego gospodarza. Bakterie te dysponują szeroką gamą czynników wirulencji (Abdullahi et al., 2022; Fulde & Valentin-Weigand, 2013). Pojemny pangenom oraz łatwość ulegania zmienności umożliwia bakteriom przystosowanie się do nowych warunków środowiska oraz gospodarzy (Fabregas et al.; Shelyakin et al., 2019).

1.3.1. Rodzaj *Streptococcus*

Proces rozwoju infekcji paciorkowcowych jest złożony i angażuje szereg czynników. Jego przebieg zależy zarówno od właściwości patogenu jak i organizmu gospodarza. Wśród jego etapów wyróżnia się przyleganie w pierwotnym miejscu zakażenia, kolonizację oraz inwazję (Castro & Dorfmüller, 2021). Czynniki wirulencji w przypadku tych bakterii stanowią adhezyny, toksyny oraz czynniki wpływające na rozprzestrzenianie w tkankach i zakłócanie odpowiedzi immunologicznej gospodarza – unikanie układu odpornościowego gospodarza, a także oporność na fagocytozę (Rojo-Bezares et al., 2021). Gatunki, a w ich obrębie także w różnym stopniu szczepy paciorkowców, wyposażone mogą być w odmienne czynniki wirulencji umożliwiające im kolonizację, rozprzestrzenianie i inwazję różnych gospodarzy. Nabywanie nowych cech wirulencji pozwala na lepsze przystosowanie się do nowego żywiciela. Przeżycie bakterii zarówno w organizmie

dotychczasowego, jak i nowego gospodarza wymaga nieprzerwanego cyklu przenoszenia (Turner et al., 2019; Wolfe et al., 2007).

W rodzaju *Streptococcus* szeroko poznana i opisana jest chorobotwórczość gatunków od dawna uznanych za patogeny człowieka, przede wszystkim *S. pyogenes*. Badania czynników wpływających na chorobotwórczość innych, w tym także nowo zagrażających człowiekowi gatunków, są odnoszone do tych, które uczestniczą w patogenezie zakażeń właśnie *S. pyogenes* (Beres et al., 2023; Kim et al., 2018). Odnoszenie się do cech tego gatunku uzasadniają badania genetyczne wskazujące na duże podobieństwo genomów różnych paciorkowców do jego szerokiego pangenomu (Watanabe et al., 2016).

1.3.1.1. Wytwarzane przez paciorkowce substancje wpływające na proces adhezji i kolonizacji gospodarza i zapoczątkowujące ich inwazję

Przyłączanie bakterii do tkanek gospodarza i początek kolonizacji ułatwia wiele czynników wytwarzanych przez paciorkowce. Procesy te następują sekwencyjnie, często z udziałem tych samych, wielozadaniowych składowych, o których będzie mowa w tym i następnym rozdziale. Prowadzą one do kolejnych etapów - inwazji rozumianej jako przenikanie między komórkami gospodarza, ale też inwazji polegającej na hamowaniu działania jego układu immunologicznego oraz bezpośredniego działania bakteryjnych białkowych toksyn.

Jednymi z najważniejszych czynników zapoczątkowujących i pogłębiających te procesy są białka M i białka M-podobne (M-like). Białka te występujące u bakterii z rodzaju *Streptococcus* ułatwiają proces adhezji, wiążąc się ze strukturami glikanów komórek gospodarza. Ich znaczenie wiąże się w największym stopniu z efektami immunomodulacyjnymi. Białka M mają właściwość łączenia się z plazminogenem i fibrynogenem, dzięki czemu bakterie unikają wrodzonej i nabytej odpowiedzi układu immunologicznego (Mills & Ghosh, 2021). U paciorkowców grupy C Lancefield, do których zalicza się między innymi *S. dysgalactiae*, wykryto szczególne białko M-podobne - tzw. białko PAM. Ma ono zdolność wiązania się z białkami surowicy takimi jak fibrynogen i albuminy, ale aktywacja plazminogenu z jego udziałem zachodzi przy współpracy ze streptokinazą. Adhezja tych paciorkowców do komórek nosogardzieli wiązana jest właśnie z połączeniem białek M-podobnych z ludzkim plazminogenem. Inne rodzaje białek M-podobnych ze względu na inną budowę sekwencji peptydów je tworzących mają zdolność wiązania się z kolagenem (Obszanska et al., 2014). Struktura genu *emm* kodującego białko M jest bardzo zróżnicowana i pozwala na ustalanie podobieństwa szczepów w obrębie gatunku. Sekwencjonowanie tego genu jest wykorzystywane w molekularnych badaniach epidemiologicznych w przypadkach ognisk zakażeń *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* (Takahashi et al., 2011).

Podobnie jak u wielu innych bakterii proces adhezji do tkanek paciorkowców wspierają wytwarzane przez nie powierzchniowe białka wiążące macierz komórkową gospodarza (ang. *microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules*, MSCRAMM). Bakterie wytwarzają ligandy dla keratyny, fibrynogenu, fibronektyny, witronektyny, lamininy, kolagenu czy albuminy (Obszanska et al., 2014; Rato et al., 2011). Wykazano zwiększone przyleganie także w obecności laktoferyny (Fessia & Odierno, 2021). Wśród paciorkowców grupy SBSEC silną zdolność przylegania do kolagenu wykazują szczepy *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*. Obserwuje się to zwłaszcza w przypadku kolagenu I, w mniejszym stopniu wobec kolagenu IV, V, fibrynogenu i fibronektyny. Zdolność ta wynika z wytwarzania przez nie adhezyn paciorkowcowych – histonopodobnego białka A (HlpA), które umożliwia przyleganie do komórek nowotworowych, czynnika wiążącego fibrynogen (FimB) oraz pili (Jans et al., 2015). Czynniki te, a szczególnie białka pili - Pil1A i Pil3 wydłużają kaskadę krzepnięcia krwi, co prowadzi do skuteczniejszej kolonizacji uszkodzonych miejsc w organizmie gospodarza. Ważną obserwacją w kontekście poszukiwania odmienności szczepów atakujących ludzi jest wykazanie, że kompletne loci pilusów mają tylko szczepy wyizolowane z krwi od ludzi. Pili te poza adhezją przyczyniają się do translokacji komórek bakteryjnych z przewodu pokarmowego do krwi gospodarza, a także unikania odporności czy wiązania kolagenu w innych tkankach m. in. na zastawkach serca. *S. gallolyticus* posiadające komplet loci pilusów to bakterie o największym potencjale zjadliwości w tej grupie paciorkowców (Jans & Boleij, 2018).

W pracach opisujących chorobotwórczość gatunków i szczepów paciorkowców zwierzęcych od niedawna dopiero izolowanych od ludzi wskazuje się na obecność adhezyn takich jak białka wiążące lamininę, fibronektynę, domniemane białka wiążące kolagen oraz enzymy, np. dehydrogenazę 3-fosforanu gliceraldehydu pośredniczące w przyłączaniu komórek bakterii do komórek ludzkich (Lo & Cheng, 2015; Lothar et al., 2017; Rato et al., 2011).

Czynnikiem wirulencji wpływającym na proces kolonizacji jest też otoczka hialuronowa pośrednicząca m. in. w przyleganiu do powierzchni nabłonka gardła i skóry. Obecna u *S. pyogenes* bezpośrednio wiąże się z glikoproteiną CD44 obecną na powierzchni ludzkich komórek. Ułatwia to inwazję, ponieważ tak jak w przypadku streptolizyn oraz egzotoksyny B, prowadzi do uszkodzenia połączeń pomiędzy komórkami gospodarza i dalszej penetracji. Otoczka hialuronowa nie stanowi jednak czynnika wirulencji wszystkich gatunków czy szczepów paciorkowców, co związane jest z określonym typem białka M lub białka M-podobnego (Brouwer et al., 2023). Otoczka u różnych gatunków nie zawsze składa się z hialuronianu jako głównej składowej – w przypadku paciorkowców β -hemolizujących czy *S. pneumoniae* otoczka jest wielocukrowa (Obszanska et al., 2014).

Ważnym enzymem wpływającym na rozprzestrzenienie się bakterii jest również hialuronidaza (Lo & Cheng, 2015; Lothar et al., 2017). Gen *hylB* kodujący

hialuronidazę występuje powszechnie wśród paciorkowców. Hialuronidaza wpływa jednak nie tylko na niszczenie tkanek i przeżycie wewnątrzkomórkowe komórek bakterii, ale także na zwiększoną ekspresję cytokin prozapalnych (Xu et al., 2021).

Zdolność tworzenia biofilmu przez bakterie rodzaju *Streptococcus* również ma duże znaczenie dla kolonizacji. Istotną rolę w jego tworzeniu ma obecność i ekspresja takich determinant wirulencji jak białko regulatorowe biofilmu (BrpA), białko A wiążące fibronektynę (FbpA), proteaza serynowa (HtrA) i prekursor streptolizyny S (Alves-Barroco, Botelho, et al., 2022). W grupie paciorkowców SBSEC do tworzenia biofilmu przyczyniają się także glukozylotransferazy odpowiedzialne za syntezę egzopolisacharydu (Jans et al., 2015).

Funkcję adhezyjną w opanowywaniu tkanek pełni również peptydaza Scp. Ma ona zdolność wiązania fibronektyny, ale bierze udział też w kolejnych etapach inwazji – trawieniu białek gospodarza oraz inaktywacji składowych układu dopełniacza gospodarza. Jej obecność stwierdzono u paciorkowców grup A, B, C i G wg Lancefield. Wskazuje się na wysoką konserwatywność genu *scp* wśród całego rodzaju *Streptococcus*. Fibrynogen czy białka macierzy zewnątrzkomórkowej oraz inne chemokiny trawione są także za pomocą innej proteazy serynowej CspA, podobnej do białka SpyCEP występującego u szczepów grupy A według Lancefield (Bryan & Shelver, 2009). Peptydaza ta pełni więc rolę zarówno adhezyny jak i inwazyjny. Wśród szczepów *S. pyogenes* zaobserwowano jej wpływ na hamowanie napływu leukocytów (Fessia & Odierno, 2021).

Kluczową rolę w patogenezie zakażeń paciorkowcowych odgrywa streptokinaza. Pośród innych aktywatorów plazminogenu, streptokinazę wyróżnia brak wewnętrznej aktywności enzymatycznej. Poprzez stymulację proteolizy białek obronnych gospodarza, wspomaga ona rozprzestrzenianie się bakterii (Nitzsche et al., 2016). Streptokinaza, prowadząc do przekształcenia plazminogenu w plazminę, aktywny enzym proteolityczny, bierze także udział w reakcjach katabolicznych włókien fibrynowych i innych białek macierzy zewnątrzkomórkowej, np. fibronektyny czy lamininy. Ekspresja streptokinazy zależna jest od dwóch systemów regulacyjnych CovRS oraz FasCAX (Andreoni et al., 2018; Obszanska et al., 2014). Streptokinaza odgrywa najważniejszą rolę w rozwoju zakażeń inwazyjnych. Wysoki poziom jej aktywności może promować rozwój martwiczego zapalenia powięzi (Andreoni et al., 2018). U *S. uberis* plazmina zwiększa dodatkowo zdolności kolonizacyjne tych bakterii, a ze względu na swoje właściwości proteolityczne, w tym zdolność rozkładu białek mleka, przyczynia się także do pozyskiwania składników odżywczych (Loures et al., 2017).

1.3.1.2. Hamowanie działania układu immunologicznego gospodarza i działanie toksyczne paciorkowców

Opisane powyżej czynniki i mechanizmy nierozdzielnie wiążą się w procesie patogenezy z oddziaływaniem produktów bakteryjnych z układem immunologicznym i ich toksycznością. Wpływające na adhezję i proces kolonizacji hialuronowe otoczki jednocześnie osłaniają komórki bakterii, znacząco zwiększając zjadliwość i oporność na fagocytozę poprzez zmniejszenie możliwości wiązania czynnika C3 dopełniacza (Wessels, 2019). Uszkodzenie tkanek gospodarza, zapoczątkowane w procesie kolonizacji, prowadzi do aktywacji odpowiedzi immunologicznej gospodarza. Dochodzi do uwolnienia katelicyny (LL-37, ang. *cathelicidin LL-37*) czy interleukin (IL-8, ang. *interleukin-8*). Do zaburzających tę aktywność paciorkowcowych czynników wirulencji należy egzotoksyna B (ang. *streptococcal pyrogenic exotoxin B*, SpeB). To proteinaza serynowa o szerokiej specyficzności substratowej – toksyna ta ma zdolność rozkładu wielu białek gospodarza – białek bariery międzykomórkowej pomiędzy komórkami nabłonka, macierzy zewnątrzkomórkowej gospodarza, składników dopełniacza (np. C3), ludzkiej immunoglobuliny, katelicyny oraz chemokin. Wskazuje się także na jej zdolność do aktywacji prekursorów interleukin (IL-1 β oraz IL-36 γ). Są one uznawane za krytyczne cytokiny prozapalne w procesie odpowiedzi immunologicznej na infekcję. Egzotoksyna B indukuje także piroptozę, czyli zaprogramowaną lityczną śmierć komórek prozapalnych. Toksyna powoduje rozszczepienie gasderminy A (Andreoni et al., 2018; Brouwer et al., 2023). Gasdermina A odpowiada za tworzenie porów w błonach komórkowych, co umożliwia sekrecję cytokin prozapalnych z grupy interleukin (Kuc-Ciepluch et al., 2021).

Wytwarzane przez paciorkowce proteiny, w tym proteinaza otoczki (SpyCEP) oraz peptydaza składowej dopełniacza C5a (Scp), również degradują mediatory i składowe odpowiedzi immunologicznej gospodarza. Proteiny otoczki degradują interleukiny IL-8, a Scp składową C5a dopełniacza, co doprowadza do upośledzenia aktywacji neutrofilów (Andreoni et al., 2018; Obszanska et al., 2014). Składowe układu dopełniacza inaktywowane są również za pomocą białka SIC (paciorkowcowy inhibitor dopełniacza, ang. *streptococcal inhibitor of complement*), zakłócając proces cytolizy. Homologi tego genu wykrywane są zarówno wśród szczepów *S. pyogenes* jak również *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* (Hule et al., 2015; Lo & Cheng, 2015).

Wiele gatunków paciorkowców ma zdolność wytwarzania hemolizyn, które odgrywają niekiedy kluczową rolę w patogenezie zakażeń. Ich wytwarzanie i aktywność wiązane są z uszkodzeniem tkanek miękkich, inwazją tkanek, jak i aktywacją odpowiedzi prozapalnej pozwalającej bakteriom na przejście przez bariery – nabłonek-śródbłonek oraz krew-mózg. Streptolizyny S (SLS, ang. *streptolysin S*) i O (SLO, ang. *streptolysin O*) są silnymi toksynami cytolitycznymi, które powodują powstawanie porów w błonach komórek eukariotycznych. Doprowadzają do

uszkodzenia nie tylko krwinek czerwonych, ale i komórek nabłonkowych oraz odpornościowych. Streptolizyna S jednocześnie hamuje rekrutację neutrofilii i ich aktywność bakteriobójczą – wpływa na uwalnianie białka związanego z kalcytoniną w zakażonych tkankach. Wskazuje się na to, że może ona brać także udział w rozwoju martwiczych zakażeń tkanek miękkich. Ponadto, jednym z miejsc docelowych działania SLS jest obwodowy układ nerwowy – w wyniku działania toksyny dochodzi do aktywacji neuronów czuciowych. Toksyna ta hamuje też aktywność komórek odpornościowych, co prowadzi do zwiększenia przeżycia bakterii podczas infekcji (Besancon et al., 2021; Lo & Cheng, 2015; Obszanska et al., 2014).

Działanie układu immunologicznego gospodarza zaburza również aktywność paciorkowcowej toksyny streptolizyny O. Zapobiega ona dojrzewaniu fagolizosomów oraz umożliwia przeżycie w makrofagach. Aktywność tej toksyny zależna jest od cholesterolu występującego na błonach komórkowych gospodarza. Cytolizyna ta tworzy pory i w konsekwencji prowadzi do lizy komórek. Występuje również współzależność jej działania z glikohydrolazą dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (NADaza). NADaza pełni rolę ko-toksyny odpowiadającej za wykorzystywanie energii komórkowej gospodarza, co również promuje przeżycie wewnątrzkomórkowe bakterii, zwiększa cytotoksyczność w makrofagach i komórkach nabłonka. Enzym ten prowadzi również do fragmentacji aparatów Golgiego. Wysoka aktywność NADazy jest obserwowana w szczepach bezotoczkowych (Nozawa et al., 2021; Shumba et al., 2019).

W opisywanych procesach hamowania aktywności układu odpornościowego bierze też udział białko M. Jego rola polega na łączeniu się z erytrocytami, które uległy lizie w wyniku działania streptolizyny S i streptolizyny O. Białko M wywołuje ponadto apoptozę makrofagów, dzięki sprowokowaniu wydzielania cytokin prozapalnych – interleukin IL1 β oraz IL18. Podobną funkcję pełnią również dodatkowo NADazy. Zabicie paciorkowców uniemożliwiają też wytwarzane przez nie deoksyrybonukleazy (DNazy). Te doprowadzają do degradacji struktur DNA pokrytych histonami i proteazami wydzielanych z neutrofilii, tzw. zewnątrzkomórkowych pułapek neutrofilii (ang. *neutrophil extracellular traps*, NETs), co prowadzi do obniżenia ich aktywności bójczej (Filipczak et al., 2023; Tanaka et al., 2020).

Znaczące zaburzenie działania układu immunologicznego gospodarza powodują wytwarzane przez bakterie z rodzaju *Streptococcus* immunomodulujące egzotoksyny pirogenne - superantygeny. Powodują one nadmierną mobilizację nabytego mechanizmu działania układu immunologicznego, wywołując niespecyficzną aktywację limfocytów T i powstanie tzw. burzy cytokinowej. Mobilizacja ta wynika z łączenia regionów zmiennych łańcuchów β receptorów limfocytów T z cząsteczkami MHC (główny układ zgodności tkankowej, ang. *major histocompatibility complex*) klasy II komórek prezentujących antygen, co skutkuje tą aktywacją. Opisano szereg różnych superantygenów wytwarzanych przez szczepy paciorkowców. Ich aktywność prowadzi do rozwoju chorób o specyficznym

przebiegu. Obecność SpeA (paciorkowcowa pirogenna egzotoksyna A, ang. *streptococcal pyrogenic exotoxin A*), SpeC (paciorkowcowa pirogenna egzotoksyna C, ang. *streptococcal pyrogenic exotoxin C*) czy SSA (superantygen paciorkowcowy, ang. *streptococcal superantigen*) wiązana jest z wywoływana przez *S. pyogenes* szkarlatyną czy zespołem wstrząsu toksycznego (McCormick et al., 2001; Reglinski et al., 2019). Opisano także superantygeny wytwarzane przez *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis*. Jednym z najczęściej występujących jest spegg (paciorkowcowa pirogenna egzotoksyna G, ang. *streptococcal pyrogenic exotoxin G*) (Lo & Cheng, 2015; Rojo-Bezares et al., 2021; Traverso et al., 2016). Jednoczesne występowanie genu tej toksyny i genu streptolizyny S związane jest z rozwojem chorób inwazyjnych powodowanych przez *S. pyogenes*. Geny te występują również wśród izolatów *S. dysgalactiae*, zarówno od ludzi i od zwierząt (Rato et al., 2011). Stwierdzono jednak, że superantygen spegg występujący u *S. dysgalactiae* ma jedynie 1% aktywności mitogennej tej toksyny występującej u *S. pyogenes* (Watanabe et al., 2016). Geny kodujące superantygeny ulokowane są najczęściej na ruchomych elementach genetycznych, w tym w bakteriofagach i dlatego łatwo mogą przenosić się między różnymi gatunkami paciorkowców. U *S. dysgalactiae* wykazano obecność genów takich toksyn immunomodulujących jak SpeH, SpeI, SpeK, SpeC, SpeL, SpeM, SmeZ, Ssa. Jest prawdopodobne, że u szczepów tego gatunku podobnie jak u *S. pyogenes* dochodzi do polilizogenii (Babbar et al., 2018; Rato et al., 2011).

Obecność w genomie bakterii genów nie jest jednoznaczna z ich ekspresją, a zatem rzeczywistą zjadliwością szczepów. U *S. pyogenes* prowadzono badania nad systemami regulacji tej ekspresji. Znalaziono systemy dwuskładnikowe i niezależne regulatory. Najlepiej poznanym jest system CovRS. Wpływa on na ekspresję 15% genomu, w tym czynników chorobotwórczości takich jak białka wiążące macierz zewnątrzkomórkową, otoczka czy toksyny. Podobny system regulacji i zmiany w zjadliwości szczepów na skutek jego mutacji znaleziono u *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* (Graham et al., 2002; Hasegawa et al., 2019).

1.3.2. Rodzaj *Staphylococcus*

Gatunek *S. pseudintermedius* jest już uznanym patogenem człowieka. Na jego chorobotwórczość składa się szereg czynników, które są funkcjonalnie spokrewnione z tymi występującymi w szczepach *S. aureus* (Ruzauskas et al., 2016).

1.3.2.1. Czynniki wpływające na proces kolonizacji tkanek przez *Staphylococcus pseudintermedius*

Wśród ważnych czynników wirulencji występujących u szczepów tego gatunku istotne znaczenie mają te, które wpływają na jego adhezję do tkanek i późniejszą jej kolonizację. Wytwarzany jest szereg białek, które zdolne są łączyć się z białkami macierzy pozakomórkowej gospodarza (Melter et al., 2017; Ruzauskas et al., 2016). Wśród aktywnych białek powierzchniowych ważną rolę odgrywają białka SpsA-SpsR, wiążące się z fibronektyną, fibrynogenem czy cytokeratyną tkanek

gospodarza. Za najważniejsze białka związane ze ścianą komórkową bakterii uznane są SpsD i SpsL odgrywające dużą rolę w czasie infekcji. Wykazano, że szczepy *S. pseudintermedius* lepiej przylegają do komórek skóry uszkodzonej lub zmienionej chorobowo, co powiązano z innym wzorcem dystrybucji fibronektyny w komórkach skóry atopowej (Chrobak-Chmiel et al., 2018). Gronkowcowe białka powierzchniowe poza funkcją spełnianą w czasie adhezji wpływają ponadto na przeżywalność bakterii, unikanie odpowiedzi immunologicznej gospodarza jak i tworzenie biofilmu. Białka te występują zarówno w szczepach powodujących infekcje jak i komensalnych *S. pseudintermedius* (Ferrer et al., 2021). W procesie adhezji *S. pseudintermedius* poza białkami powierzchniowymi Sps ważne jest też białko wiążące elastynę EbpS (Wang et al., 2022). Wytwarzanie śluzu ułatwia zapoczątkowanie tworzenia biofilmu, który odgrywa dużą rolę w wirulencji gronkowców. Jego budowanie zależy od syntezy polisacharydowej adhezyny międzykomórkowej (ang. *polysaccharide intercellular adhesin*, PIA) kodowanej przez operon *ica* składający się z czterech genów *icaA*, *icaB*, *icaC* oraz *icaD*. Zdolność do tworzenia biofilmu u szczepów *S. pseudintermedius* jest jednak złożona i zależy także od innych czynników, ponieważ stwierdzano jego występowanie u szczepów, u których nie znaleziono operonu *ica* (Meroni et al., 2019).

S. pseudintermedius syntetyzują zewnątrzkomórkowe proteazy i lipazy. Enzymy te warunkują rozpad łoju oraz komórek warstwy ochronnej skóry, co sprzyja kolonizacji i rozprzestrzenianiu się bakterii (Kmieciak & Szewczyk, 2018; Stempelova et al., 2022). Znaczącą rolę w zakażeniach odgrywają proteazy, które wpływają na proces adhezji, kolonizacji i rozprzestrzenianie bakterii w organizmie gospodarza. Udowodniono, że mutanty pozbawione tych enzymów charakteryzowały się zmniejszoną zjadliwością, rozprzestrzenianiem oraz inwazją *in vitro*. Ważną funkcję w procesie kolonizacji odgrywa również DNaza ułatwiająca tworzenie skupisk oraz biofilmu bakteryjnego (Brown et al., 2020).

Podobnie jak u *S. aureus* duże znaczenie w patogenezie zakażeń *S. pseudintermedius* ma koagulaza. To zewnątrzkomórkowe białko wiąże się z protrombiną gospodarza, przekształcając fibrynogen w fibrynę (Chrobak-Chmiel et al., 2018). Agregacja płytek krwi i zlepianie bakterii w osoczu chronią je przed fagocytozą (Lacey et al., 2019).

Mimikrę – skuteczne ukrywanie się przed działaniem układu odpornościowego zapewnia także występujące na powierzchni komórek *S. pseudintermedius* białko A. Ma ono zdolność wiązania przez fragment krystalizujący przeciwciał klasy IgG i zmniejsza w ten sposób efektywność organizmu gospodarza do rozpoznawania i opsonizacji tych gronkowców. Wykazano także, że limfocyty B po ekspozycji na białko A podlegają indukowanej śmierci komórkowej. Podobnie jak w przypadku *S. aureus* białko A szczepów *S. pseudintermedius* odgrywa również rolę w tworzeniu biofilmów (Balachandran et al., 2018; Kalhor et al., 2017). Utrudnianie opsonizacji oraz późniejszej fagocytozy powodują również obecne polisacharyd otoczkowy i kwasy tejchojowe (Chrobak-Chmiel et al., 2018). Produkowana przez szczepy tego

gatunku kwaśna fosfataza hamuje działanie neutrofilii, wpływając na przeżywalność drobnoustrojów w organizmie gospodarza (Stempelova et al., 2022).

1.3.2.2. Toksyny *Staphylococcus pseudintermedius*

Znaczącymi czynnikami wirulencji wpływającymi na rozwój infekcji powodowanych przez wyposażone w nie szczepy *S. pseudintermedius* są toksyny. Są wśród nich zarówno cytotoksyny (hemolizyny, leukotoksyny), jak i toksyny o właściwościach immunomodulujących np. toksyna zespołu wstrząsu toksycznego (ang. *toxic shock staphylococcal toxin*, TSST) czy enterotoksyny (ang. *staphylococcal enterotoxins*, SE). Opisano także szczepy zdolne do wytwarzania toksyn złuszczących (ang. *S. intermedius exfoliative toxin*, SIET; toksyny eksfoliatywne, ang. *exfoliative toxin*, EXI) (Pitchenin et al., 2017).

Mechanizm działania toksyn immunomodulujących *S. pseudintermedius* jest podobny do wytwarzanych przez inne ziarenkowce gramdodatnie. Duża ilość wyzwolanych cytokin nasila proces zapalny i może prowadzić do wystąpienia wstrząsu. Z działaniem tych toksyn wiązany jest szereg jednostek chorobowych jak zatrucie pokarmowe, zapalenie stawów, zapalenie sutka, atopowe zapalenie skóry, nieswoiste zapalenie jelit a także rozwój chorób autoimmunologicznych (Pitchenin et al., 2017). W szczepach *S. pseudintermedius* wykrywano geny enterotoksyn takich jak SEA, SEB, SEC, SED. Specyficznymi enterotoksynami *S. pseudintermedius* są SECcanine oraz SE-int. SECcanine wraz z toksynami złuszczącymi może odgrywać rolę w rozwoju piodermii (Chrobak-Chmiel et al., 2018; Melter et al., 2017).

Wytwarzane przez szczepy *S. pseudintermedius* leukotoksyny – LukSF-I zarówno w działaniu jak i budowie przypominają leukocydynę Panton-Valentine (ang. *Panton-Valentine leukocidin*, PVL) *S. aureus*. Toksyna występująca u *S. pseudintermedius* również jest dwuskładnikowa, kodowana przez geny *lukS* i *lukF*, które ulegają transkrypcji równocześnie (Kalhor et al., 2017). Wykazuje ona silną toksyczność wobec leukocytów i makrofagów, atakując błony lipidowe. Podkreśla się także jej rolę w tłumieniu odporności komórkowej gospodarza i powstawaniu zmian martwiczych (Chrobak-Chmiel et al., 2018; Miszczak et al., 2021; Ruzauskas et al., 2016). Szczepy *S. pseudintermedius* wytwarzają hemolizynę, niewiele jednak jest dowodów na jej rolę w rozwoju zakażenia, chociaż w przypadku hemolizyny *S. aureus* wskazuje się na jej cytotoksyczność wobec komórek gospodarza, a także jej udział w tworzeniu biofilmu (Brown et al., 2020). Do wytwarzanych przez *S. pseudintermedius* toksyn odpowiedzialnych za uszkodzenie warstwy lipidowej błon gospodarza zaliczane są również modulatory rozpuszczalne w fenolu (ang. *phenol soluble modulins*, PSM). PSM wykazują działania plejotropowe – poza uszkodzeniem błon komórkowych wykazują aktywność cytotoksyczną wobec psich keratynocytów, ludzkich komórek nabłonkowych czy osteoblastów a także wpływają na kolonizację oraz regulują tworzenie biofilmów (Maali et al., 2018; Miszczak et al., 2021).

Wytwarzane przez *S. pseudintermedius* toksyny złuszczone trawia desmogleinę, prowadząc do rozszczenia naskórka (Chrobak-Chmiel et al., 2018). Toksyny te odgrywają dużą rolę w przypadku zakażeń powłok skórnych, np. piodermii oraz przewlekłego zapalenia ucha, zwłaszcza u psów (Pitchenin et al., 2017; Ruzauskas et al., 2016). Wśród toksyn złuszczone wymienia się SIET i EXI (Melter et al., 2017). Działanie pierwszej z nich prowadzi do powstania rumienia, złuszczenia i przypomina zespół skóry poparzonej, wysiękowe zapalenie naskórka czy piodermię (Kalhoro et al., 2017). Toksyna EXI to toksyna eksfoliatywna odpowiadająca za powstawanie pęknięć podrogówkowych naskórka, co klinicznie może przypominać rozszczenie śródskórkowe występujące u zwierząt (Chrobak-Chmiel et al., 2018). Geny kodujące toksynę EXI występują jednak rzadko wśród szczepów *S. pseudintermedius*, na poziomie kilku procent (Meroni et al., 2019).

1.4. Lekowrażliwość ziarenkowców gramdodatnich stanowiących przedmiot tej pracy

1.4.1. Możliwości terapeutyczne w zakażeniach paciorkowcami

Oporność na antybiotyki wśród rodzaju *Streptococcus* nabywana jest najczęściej na drodze horyzontalnego transferu genów lub w wyniku mutacji punktowych. Szczepy paciorkowców łatwo ulegają presji selekcyjnej, co skutkuje utrzymywaniem się oporności i dalszym przekazywaniem tych genów, zwłaszcza w populacjach bytujących w tych samych niszach ekologicznych (Alves-Barroco et al., 2020). Niestety liczne prace pokazują narastanie oporności w tej grupie bakterii, co zasadniczo ogranicza możliwości terapeutyczne.

W leczeniu zakażeń spowodowanych przez paciorkowce najistotniejszą grupą leków są antybiotyki β -laktamowe. Uważa się, że szczepy *S. pyogenes* wykazują pełną wrażliwość, ale niedawno opisano dwa izolaty *S. pyogenes* o obniżonej wrażliwości na ampicylinę, amoksycylinę i cefotaksym (Vannice et al., 2020). Oporność na penicyliny wśród licznych szczepów gatunków izolowanych od ludzi odnotowano w przypadku *S. agalactiae* oraz *S. pneumoniae*. Oporność na tę grupę antybiotyków wśród paciorkowców związana jest ze zmianą w miejscu wiązania białek wiążących penicyliny (ang. *penicillin-binding proteins*, PBP). Pierwsze szczepy pneumokoków odporne na penicyliny pojawiły się w latach 70. XX wieku. Obecnie oporność na penicylinę u pneumokoków może dochodzić nawet do 60% (Alves-Barroco et al., 2020; Amari et al., 2023; Barros, 2021; Manyahi et al., 2023; Rantala, 2014). Wśród innych gatunków z rodzaju *Streptococcus*, powodujących zakażenia u zwierząt jak i u ludzi, także pojawiają się szczepy odporne na penicyliny: benzylpenicylinę czy ampicylinę. Oporność tę opisano w grupie gatunków kompleksu SBSEC – dotyczyła ona szczepów *S. infantarius* subsp. *infantarius*, ale także *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus* (dos Santos et al., 2020). Oporność na penicylinę spotykana jest również wśród szczepów *S. dysgalactiae*. Minimalne stężenie hamujące wzrost drobnoustrojów (ang. *Minimum Inhibitory Concentration*, MIC) tego gatunku dla

penicyliny oscylowało w granicach 2 µg/ml przy wartości granicznej MIC 0,12 µg/ml lub niższej (Barros, 2021; Furst et al., 2016). W inwazyjnych zakażeniach powodowanych przez ten gatunek paciorkowców zaleca się stosowanie cefalosporyn II i III generacji (Rantala, 2014). Jednak pojawiły się także szczepy odporne na cefotaksym. Oporność tą stwierdzono w krajach azjatyckich, co może mieć związek ze stosowaniem antybiotyków β-laktamowych w weterynarii (Shen et al., 2021). Także wśród szczepów *S. uberis* w ostatnich latach obserwuje się wzrastającą oporność na antybiotyki β-laktamowe. W grupie ponad 250 izolatów podwyższone MIC dla oksacyliny zaobserwowano w przypadku ponad 50% szczepów (Haenni et al., 2018; McDougall et al., 2020). Opisano także występowanie szczepów tego gatunku opornych na cefalosporyny (Martins et al., 2021).

Oporność na fluorochinolony opisywano u *S. pyogenes*, *S. agalactiae*, *S. pneumoniae* czy paciorkowców z grupy Viridans, a także szczepów *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae*, co stawia pod znakiem zapytania możliwość wykorzystywania tej grupy chemioterapeutyków w terapii (Alves-Barroco et al., 2020).

Niestety wśród paciorkowców powszechna jest też oporność na makrolidy, linkozamidy i tetracykliny. Dotyczyć ona może pneumokoków, ale i innych gatunków, a w tym nowych patogenów człowieka (Alves-Barroco et al., 2020; Barros, 2021). Wśród szczepów *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus* oporność ta może dotyczyć nawet 90% szczepów (Li et al., 2019). Oporność na tetracyklinę często współwystępuje z opornością na erytromycynę, co ma związek ze wspólnym przenoszeniem genów *tetM* oraz *ermB*. Taki związek zaobserwowano u szczepów *S. pyogenes*, *S. agalactiae* oraz *S. dysgalactiae* (Alves-Barroco et al., 2020). Oporność na makrolidy, linkozamidy i streptograminy wiąże się u paciorkowców z występowaniem metylaz rybosomalnych kodowanych przez geny klasy *erm*. Mogą również występować geny *mef* czy *msr* kodujące oporność tylko na grupę antybiotyków makrolidowych dzięki ekspresji pomp wypływowych. Oporność na linkozamidy może być związana z występowaniem genów *lnu*, które odpowiadają za zmianę miejsca wiązania antybiotyku (Barros, 2021; Zhang et al., 2021). Oporność na tetracykliny, makrolidy i linkozamidy jest powszechna wśród *S. dysgalactiae* (Alves-Barroco et al., 2020). Liczne odporne szczepy znaleziono wśród *S. uberis* i *S. parauberis*. Najbardziej rozpowszechnione są wśród nich geny: *tetM* kodujący oporność na tetracykliny oraz *ermB* kodujący oporność na makrolidy, linkozamidy i streptograminy (ang. *resistance to macrolide, lincosamide and streptogramin B*, MLS_B) (Martins et al., 2021; Shen et al., 2021; Zhang et al., 2020). Szerokie stosowanie w niektórych krajach makrolidów, zwłaszcza azytromycyny, w czasie leczenia COVID-19, może prowadzić do dalszego wzrostu oporności paciorkowców na tę grupę leków (Barros, 2021).

W ostatnich latach wzrasta także oporność na tetracykliny kodowana ekspresją genów *tetM*, *tetK*, *tetL* oraz *tetO*. Może to mieć związek z powszechnym stosowaniem oksytetracykliny w leczeniu zwierząt, a także stosowaniem, w niektórych krajach tej grupy antybiotyków jako dodatku do pasz. Tetracykliny cechuje powolna eliminacja

z organizmu gospodarza, co dodatkowo zwiększa presję selekcyjną wśród szczepów (Barros, 2021; Choi et al., 2003; Zhang et al., 2021).

Szczególnie niepokojąca jest opisywana coraz częściej oporność na rzadziej stosowane antybiotyki. Pojawiają się szczepy *S. dysgalactiae* odporne na chloramfenikol. Wśród paciorkowców oporność na ten antybiotyk dotyczy także szczepów *S. pyogenes* oraz *S. agalactiae*. Enzymy odpowiedzialne za oporność na chloramfenikol, acetylotransferazy chloramfenikolu (ang. *chloramphenicol acetyltransferase*, CAT), kodowane są najczęściej na plazmidach, których kilka typów jest wspólnych dla bakterii rodzajów *Streptococcus*, *Staphylococcus* i *Enterococcus* (Alves-Barroco et al., 2020).

Wśród szczepów *S. agalactiae* opisano oporność na wankomycynę o wartości MIC wynoszącej 4 µg/ml przy wartości granicznej 1 µg/ml. Potwierdzono obecność w ich genomach genów *vanG*, kodujących oporność na wankomycynę, identycznych z występującymi u *Enterococcus faecalis* (Barros, 2021). Wśród bakterii kompleksu SBSEC wykazano oporność na metronidazol i antybiotyki glikopeptydowe, wankomycynę i teikoplaninę (Choi et al., 2003; dos Santos et al., 2020). W Azji znaleziono pierwsze szczepy odporne jednocześnie na wankomycynę i linezolid (Shen et al., 2021).

Jak widać z powyższego przeglądu możliwości terapeutyczne w zakażeniach ludzi nowymi paciorkowcami pochodzącymi od zwierząt są ograniczone.

1.4.2. Możliwości terapeutyczne w zakażeniach *S. pseudintermedius*

Leczenie zakażeń *S. pseudintermedius* zarówno u zwierząt, ale także u ludzi stanowi obecnie znaczne wyzwanie terapeutyczne ze względu na rosnącą wieloraką lekooporność szczepów tego gatunku (Brown et al., 2020). Obserwuje się coraz częstsze pojawianie się metycylinyoporności niosącej ograniczenie zastosowania antybiotyków β-laktamowych. Ulokowany na ruchomych elementach genetycznych, gronkowcowych kasetach SCCmec, gen *mecA* ma zdolność przenoszenia się między różnymi gatunkami gronkowców (Kalhor et al., 2017). Powszechne jest występowanie u szczepów tego gatunku β-laktamaz kodowanych przez gen *blaZ*. Podkreśla się, że oporność na grupę antybiotyków β-laktamowych wśród szczepów *S. pseudintermedius* w ostatnich latach wzrasta a sama grupa penicylin wykazuje bardzo niską skuteczność, gdyż oporność sięga ponad 90% (Silva et al., 2021; Wang et al., 2022).

Niska skuteczność terapeutyczna dotyczy także antybiotyków aminoglikozydowych. Ważną wskazówką może być jednak informacja, że odwrotnie niż to jest w przypadku większości szczepów *S. aureus*, u *S. pseudintermedius* częściej występuje oporność wobec kanamycyny niż gentamicyny (Silva et al., 2021).

Oporność wszystkich gronkowców dotyczy także grupy antybiotyków makrolidowych i linkozamidów, co jest związane z powszechną obecnością w ich

genomach genów z klasy *erm* (*ermA*, *ermB*, *ermC* oraz *msrA* i *msrB*). Często występuje także oporność na tetracykliny kodowana przez geny *tet* (*tetM* i *tetK*) (Bhooshan et al., 2020; Silva et al., 2021). Wiele jest szczepów gronkowców, w tym i *S. pseudintermedius*, opornych na fluorochinolony. Liczne występowanie szczepów opornych na fluorochinolony oraz tetracykliny może wynikać z ich powszechnego stosowania w leczeniu zakażeń u zwierząt (Ruzauskas et al., 2016).

Terapia pojawiających się u ludzi zakażeń *S. pseudintermedius* może stanowić zatem poważną trudność. Możliwe jest jednak zastosowanie antybiotyków, które nie są stosowane w weterynarii. Należą do nich linezolid, wankomycyna i daptomycyna (Ruzauskas et al., 2016).

2. Założenia i cel pracy

Pandemia COVID-19 skierowała uwagę badaczy na zjawisko przenoszenia się drobnoustrojów zwierzęcych na nowego gospodarza – człowieka. Nie jest to zjawisko nowe i dotyczy nie tylko patogenów wirusowych, ale także bakteryjnych. Zmiany ewolucyjne, które do tego prowadzą, w domenie bakterii zachodzą jednak znacznie wolniej niż w przypadku wirusów. Można je obserwować wśród wielu rodzajów bakterii, ale dobre tego przykłady znajdują się w obrębie rodzajów *Streptococcus* i *Staphylococcus*, które stały się przedmiotem tej pracy.

Szczególnie w rodzaju *Streptococcus* można wyróżnić gatunki znajdujące się na różnych etapach przełamania bariery międzygatunkowej. Wśród nich *S. agalactiae* jest przykładem patogenu, który, choć jest izolowany pierwotnie i często od zwierząt, od dawna powszechnie spotykany jest także jako czynnik etiologiczny chorób występujących i przenoszonych się wśród ludzi. Z kolei w rodzaju *Staphylococcus* zaadaptowany już do ludzkiego gospodarza *S. pseudintermedius* zyskuje miano ludzkiego patogenu bardzo powoli a ta jego pozycja nie jest jeszcze ugruntowana i wymaga szeregu dalszych badań.

Badania podjęte w ramach niniejszej rozprawy zmierzały do oceny zdolności zaadaptowania wybranych gatunków z rodzajów *Streptococcus* i *Staphylococcus* do gospodarza, jakim jest człowiek. Zakładano poszukiwania wielokierunkowe. Przedmiotem prowadzonych analiz były dwa gatunki paciorkowców: *Streptococcus dysgalactiae* i *Streptococcus gallolyticus* oraz gronkowce *Staphylococcus pseudintermedius*, których izolacja z materiału klinicznego od ludzi nie jest już obecnie zaskakująca. Jednocześnie są one powszechnie izolowane z infekcji od zwierząt. Do grupy szczepów badanych dołączono też gatunki krańcowo rzadko izolowane od ludzi - paciorkowce *Streptococcus uberis* i *Streptococcus parauberis*.

Większość wybranych do tych badań szczepów stanowiło poważne wyzwanie identyfikacyjne, od którego należało rozpocząć badania, aby wyciągane wnioski mogły mieć wkład w rozwój nauki. Rozpoczynając badania należało przyjąć, że na adaptację patogenu zwierzęcego do człowieka muszą mieć wpływ cechy składające się na jego zdolności kolonizacyjne oraz inwazyjność. Wśród tych cech postanowiono szukać wyznaczników, które mogą wpływać na przystosowanie do nowego gospodarza. Niezwykle ciekawe wydało się także zbadanie, jakimi możliwościami terapeutycznymi może dysponować lekarz w wypadku rozwoju zakażenia człowieka tymi szczepami.

W trakcie badań wyłonił się zatem szeroki ich cel polegający na poszukiwaniu możliwości oceny stopnia zagrożenia ze strony pojawiających się nowych patogenów. Jednocześnie założono, że być może uda się znaleźć cechy o kluczowym znaczeniu, które mogłyby stanowić rodzaj markera pozwalającego ocenić, na ile wyizolowany szczep jest zwierzęcy, a na ile już jest zdolny do infekowania ludzi.

3. Materiały

Przedmiot badań stanowiły szczepy rodzaju *Streptococcus* oraz *Staphylococcus* izolowane z materiałów klinicznych pochodzących od ludzi i zwierząt.

3.1. Rodzaj *Streptococcus*

3.1.1. Szczepy bakterii

Szczepy badane z rodzaju *Streptococcus* należały do czterech gatunków: *S. dysgalactiae*, *S. gallolyticus*, *S. parauberis*, *S. uberis*.

Szczepy *S. dysgalactiae* pochodzące z materiałów klinicznych od ludzi uzyskane zostały z Laboratorium Medycznego Synevo w Łodzi. Wszystkie te izolaty zostały zidentyfikowane metodą MALDI TOF MS (spektroskopia mas z laserową jonizacją próbki wspomaganą matrycą z detektorem czasu przelotu, ang. *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization – Time Of Flight Mass Spectrometry*) jako podgatunek *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis*.

Szczepy *S. gallolyticus* uzyskane zostały z Laboratoriów Samodzielnego Publicznego Szpitala Klinicznego nr 1 oraz nr 2 w Szczecinie. Szczepy te zostały tam zidentyfikowane do poziomu gatunku metodami fenotypowymi.

Wszystkie szczepy pochodzące od zwierząt, z próbek mleka od krów z zapaleniem wymion z hodowli w powiecie sieradzkim, wyizolowano i zidentyfikowano.

Postępowanie potwierdzające lub prowadzące do identyfikacji badanych szczepów było jednym z zadań w niniejszej rozprawie.

Końcowe wyniki identyfikacji oraz informacje o pochodzeniu i miejscu izolacji szczepów badanych przedstawiono w Tabelach A1 w rozdziale Aneks.

3.1.2. Szczepy kontrolne wykorzystywane w trakcie badań

Jako kontrole dodatnie i ujemne zastosowano szczepy referencyjne z kolekcji The American Type Culture Collection (Amerykańska Kolekcja Hodowli Komórkowych, ATCC), National Collection of Type Cultures (Narodowa Kolekcja Kultur Typowych [Wielka Brytania], NCTC), German Collection of Microorganisms (Niemiecka Kolekcja Mikroorganizmów, DSM), szczepy wzorcowe i wskaźnikowe pochodzące z kolekcji Zakładu Mikrobiologii Farmaceutycznej i Diagnostyki Mikrobiologicznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi (ZMF), z kolekcji Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów (Polska Kolekcja Mikroorganizmów, PCM).

- *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615
- *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619
- *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* ATCC 12394
- *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* ATCC 12449 (H64A)

- *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* NCTC 4669
- *Streptococcus uberis* DSM 20569
- *Streptococcus parauberis* DSM 6632
- *Streptococcus gallolyticus* ZMF SV107
- *Streptococcus gallolyticus* ZMF SV901
- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
- *Staphylococcus aureus* NCTC 4135
- *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228
- *Bacillus cereus* PCM 1948

3.1.3. Warunki przechowywania szczepów

Wszystkie wykorzystywane w badaniach szczepy przechowywano w bulionie Todd-Hewitt (Oxoid) z dodatkiem 50% glicerolu w temperaturze -80°C w zamrażarce niskotemperaturowej MDF-DU300H-PE (Panasonic).

3.1.4. Podłoża mikrobiologiczne

3.1.4.1. Podłoża stosowane do namnażania szczepów

- Podłoże agarowe z dodatkiem 5% odwłóknionej krwi baraniej (Columbia Agar and Blood, Oxoid)
- Podłoże płynne Todd-Hewitt (Oxoid)

3.1.4.2. Podłoża stosowane w procesie identyfikacji szczepów bakterii z mleka krowiego

- Podłoże agarowe z dodatkiem 5% odwłóknionej krwi baraniej (Columbia Agar and Blood, Oxoid)
- Podłoże agarowe (BIOMED)
- Podłoże MacConkeya (GRASO Biotech)
- Podłoże z żółcią i eskuliną D-Coccosel Agar (BioMérieux)

3.1.4.3. Podłoża stosowane do określania cech fenotypowych

3.1.4.3.1. Podłoża do badania właściwości proteolitycznych

- Podłoże płynne mózgowo-sercowe (ang. *Brain Heart Infusion*, BHI) (Emapol) z dodatkiem 15% żelatyny
- Podłoże agarowe BHI z dodatkiem 10% odtłuszczonego mleka

3.1.4.3.2. Podłoża do badania właściwości lipolitycznych

- Podłoże agarowe BHI z dodatkiem 10% Tween 80 (MP Biomedicals) oraz 0,01% CaCl₂ (POCH)

- Podłoże agarowe BHI z dodatkiem żółtka jaja kurzego (6,25/100g)

3.1.4.3.3. Podłoża do badania właściwości glikolitycznych

- Podłoże płynne z dodatkiem 50% surowicy bydlęcej (Sigma-Aldrich) i 0,2% roztworu czerwieni fenolowej (POCH) w 50% etanolu (POCH) zawierające badany cukier

3.1.4.3.4. Podłoża do badania zdolności do wyrastania w surowicy

- Podłoże płynne Todd-Hewitt (Oxoid)

3.1.4.3.5. Podłoża do badania aktywności streptokinazy

- 1% podłoże agarowe w buforze TAE (Tris/Octan/EDTA) (EUR_x) z 5% dodatkiem odtłuszczonego mleka

3.1.4.3.6. Podłoża do oznaczania lekowrażliwości

- Podłoże Mueller-Hinton z 5% dodatkiem krwi końskiej i 20 mg/L β-NAD (Oxoid)

3.1.4.3.7. Podłoża do oznaczania zdolności tworzenia biofilmu

- Podłoże płynne Tryptic Soy Broth (bulion tryptozowo-sojowy, TSB) (Oxoid) z 1% dodatkiem glukozy (Difco)

3.1.4.3.8. Podłoża zastosowane do hodowli szczepów przed procedurą izolacji DNA i RNA

- Podłoże płynne Todd-Hewitt (Oxoid)

3.1.5. Odczynniki, bufony oraz gotowe zestawy

3.1.5.1. Odczynniki do prób biochemicznych

- Wykrywanie katalazy: 3% roztwór H₂O₂ (HASCO-LEK)

Odczynniki wykorzystane do odczytów pasków API 20 STREP (BioMérieux):

- NIN (ninhydryna 7 g, metanol 40 ml, dimetylosulfotlenek 60 ml)
- VP 1 (40% roztwór wodorotlenku potasu)
- VP 2 (12% roztwór α-naftol w etanolu)
- ZYM A (Tris 25g, HCl (37%) 11 ml, laurylosiarczan sodu 10 g, woda 100 ml)
- ZYM B (mieszanina metanolu i DMSO 3:7)

3.1.5.2. Odczynniki do badania zdolności wyrastania szczepów w surowicy

- Surowica ludzka (Sigma-Aldrich)
- Surowica bydlęca (Sigma-Aldrich)

3.1.5.3. Odczynniki do badania aktywności streptokinazy

- Ludzki plazminogen (Sigma-Aldrich)
- Bydlęcy plazminogen (Sigma-Aldrich)
- Substrat chromogenny: N-(p-Tosyl)-Gly-Pro-Lys 4-nitroanilide acetate salt (Chromozym, Sigma-Aldrich)
- Wodny roztwór glicyny (100 mM) (POCH)
- Bufory Tris-HCl (50 mM; pH=8,2 oraz 7,4)
- Roztwór NaCl (150 mM)

3.1.5.4. Krążki antybiogramowe do oznaczania lekowrażliwości metodą dyfuzyjno-krążkową (Oxoid)

• Benzylpenicylina	1 U
• Ampicylina	2 µg
• Cefuroksym	30 µg
• Cefepim	30 µg
• Norfloksacyna	10 µg
• Erytromycyna	15 µg
• Klindamycyna	2 µg
• Tetracyklina	30 µg
• Wankomycyna	5 µg
• Tigecyklina	15 µg
• Linezolid	10 µg
• Rifampicyna	5 µg
• Sulfametoksazol/trimetoprim	25 µg

3.1.5.5. Odczynniki do oznaczania zdolności tworzenia biofilmu

- Roztwór PBS (buforowana fosforanem sól fizjologiczna) (pH=7,2) (GIBCO)
- 1% roztwór fioletu krystalicznego (Chempur)
- Roztwór odbarwiający zawierający 10% metanolu (Chempur) i 7,5% lodowatego kwasu octowego (Lach:ner)

3.1.5.6. Odczynniki i materiały wykorzystane w badaniach genetycznych

3.1.5.6.1. Odczynniki do izolacji DNA

W celu izolacji genomowego DNA badanych szczepów zastosowano zestaw Genomic Micro AX Bacteria+ Gravity (A&A Biotechnology) składający się z:

- Bufor do zawieszania bakterii (BS)
- Lizozym
- Mutanolizyna rekombinowana
- Bufor lizujący (LSU)
- Proteinaza K
- Roztwór równoważący (K1)
- Pierwszy bufor płuczący (W1G)
- Drugi bufor płuczący (W2)
- Bufor elucyjny (E)
- Bufor zobojętniający (N)

3.1.5.6.2. Odczynniki do izolacji RNA

W celu izolacji bakteryjnego RNA badanych szczepów zastosowano zestaw GeneJET RNA Purification Kit (Thermo Scientific) składający się z:

- Bufor lizujący
- Proteinaza K
- 96% Etanol
- Pierwszy bufor płuczący
- Drugi bufor płuczący
- Woda wolna od nukleaz

Próbki zabezpieczono przed działaniem RNaz poprzez zastosowanie inhibitora RNaz (A&A Biotechnology) w objętości 1 μ l.

3.1.5.6.3. Odczynniki do klasycznej reakcji PCR

- PCR Mix Plus (A&A Biotechnology) zawierający antyinhibitor łańcuchowej reakcji polimerazy (ang. *polymerase chain reaction*, PCR) i polimerazę DNA Taq. 2x stężoną
- Woda wolna od nukleaz (A&A Biotechnology)
- Startery właściwe dla określonej reakcji (Genomed S.A.)

3.1.5.6.4. Odczynniki do reakcji PCR w czasie rzeczywistym

- Zestaw do odwrotnej transkrypcji TranScriba Kit (A&A Biotechnology) zawierający inhibitor RNaz i standardowe startery
- Gotowa mieszanina do Real-time PCR z SYBR Green RT PCR Mix SYBR (A&A Biotechnology)

3.1.5.6.5. Odczynniki do elektroforezy w żelu agarozowym

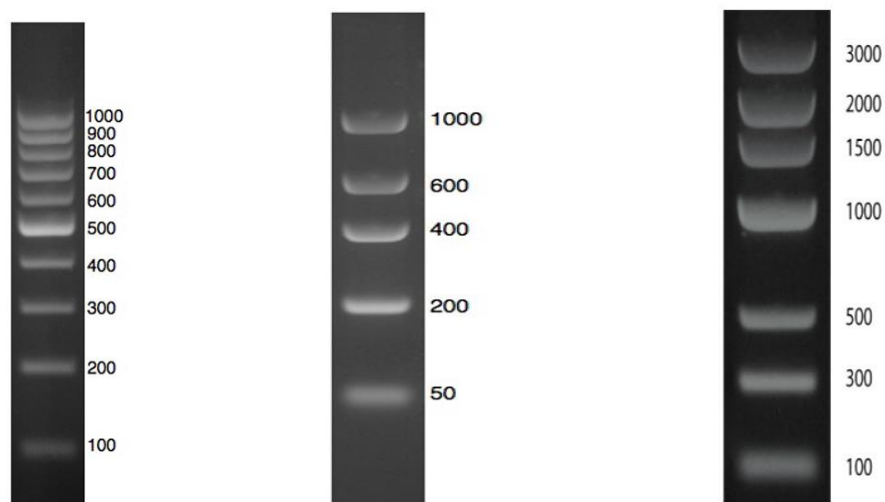
W trakcie badań przygotowywano żele agarozowe o stężeniu od 1 do 2%, uwzględniając wielkości oczekiwanych prążków.

1) 1-2% żel agarozowy:

- Agaroz (Sigma-Aldrich) 1 – 2 g
- Bufor TAE (Tris-Octan-EDTA; rozcieńczony 50x) (EUR_x) 100 ml
- Barwnik Midori Green (NIPPON Genetics Europe GmbH) 1,5 µl

2) Markery wielkości DNA (A&A Biotechnology) (Rycina 1)

- DNA Marker 1 (100-1000 pz)
- DNA Marker 2 (50-1000 pz)
- DNA Marker 3 (100-3000 pz)



Rycina 1. Markery wielkości DNA (od lewej DNA Marker 1, DNA Marker 2, DNA Marker 3).

3.1.6. Aparatura

- zamrażarka niskotemperaturowa MDF-DU300H-PE (Panasonic)
- vortex Mixer (Labnet)
- waga analityczna WPS 510/C (RADWAG)
- densytometr DEN-1 (Biosan)
- mikrowirówka laboratoryjna MPW-52 (MPW MED. INSTRUMENTS)
- wirówka MPW-350R (MPW MED. INSTRUMENTS)

- termomikser TS-100 (Biosan)
- termocykler T Professional Basic Thermocycler Gradient (Biometra)
- termocykler MJ Mini Personal Thermal Cycler (Bio-Rad)
- zestaw do elektroforezy horyzontalnej Bio-Rad Sub-Cell GT (Bio-Rad) oraz Bio-Rad Power Pac 200 power supply (Bio-Rad)
- kamera UV (Syngen)
- spektrofotometr mikroplótkowy EPOCH (BioTek)
- spektrofotometr Genova Nano (Jenway)
- system do Real-time PCR: BIO-RAD CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)

3.1.7. Programy komputerowe

- *apiweb* (bioMérieux) – oprogramowanie do odczytu pasków testów identyfikacyjnych API
- Scion Image (Syngen) – oprogramowanie do wizualizacji i archiwizacji zdjęć rozdziałów elektroforetycznych
- MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 11 (oprogramowanie open source) – program wykorzystywany przy opracowaniu analiz molekularnych

3.1.8. Usługi zlecone

- synteza oligonukleotydów (Genomed S.A.)
- sekwencjonowanie DNA (Genomed S.A.)

3.2. Rodzaj *Staphylococcus*

3.2.1. Szczepy bakterii

Przedmiot badań stanowiły szczepy gatunku *Staphylococcus pseudintermedius* izolowane z materiałów pochodzących od ludzi i zwierząt w medycznych laboratoriach diagnostycznych oraz weterynaryjnych w Łodzi. Szczepy należą do kolekcji własnej Zakładu Mikrobiologii Farmaceutycznej i Diagnostyki Mikrobiologicznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi i zostały zidentyfikowane genetycznie. Informacje dotyczące tych szczepów badanych zebrano w Tabeli A2 w rozdziale Aneks.

3.2.2. Szczepy kontrolne wykorzystywane w trakcie badań

Jako kontrole dodatnie i ujemne zastosowano szczepy referencyjne z kolekcji The American Type Culture Collection (ATCC), National Collection of Type Cultures (NCTC), German Collection of Microorganisms (DSM), szczepy wzorcowe i wskaźnikowe pochodzące z kolekcji Zakładu Mikrobiologii Farmaceutycznej i Diagnostyki Mikrobiologicznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi (ZMF) oraz z kolekcji Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów (PCM).

- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

- *Staphylococcus aureus* ATCC 29213
- *Staphylococcus aureus* NCTC 4135
- *Staphylococcus pseudintermedius* PCM 2791
- *Staphylococcus intermedius* ATCC 29663
- *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228
- *Bacillus cereus* PCM 1948

3.2.3. Warunki przechowywania szczepów

Wszystkie wykorzystywane w badaniach szczepy przechowywano w bulionie BHI z dodatkiem 50% glicerolu w temperaturze -80°C w zamrażarce niskotemperaturowej MDF-DU300H-PE (Panasonic).

3.2.4. Podłoża mikrobiologiczne

3.2.4.1. Podłoża stosowane do namnażania szczepów

- Podłoże stałe agarowe z dodatkiem 5% odwłóknionej krwi baraniej (Columbia Agar and Blood, Oxoid)
- Podłoże stałe agarowe
- Podłoże płynne BHI (BioMaxima)

3.2.4.2. Podłoża stosowane do określania cech fenotypowych

3.2.4.2.1. Podłoża do badania właściwości proteolitycznych

- Podłoże płynne BHI z dodatkiem 15% żelatyny
- Podłoże agarowe BHI z dodatkiem 10% odtłuszczonego mleka

3.2.4.2.2. Podłoża do badania właściwości lipolitycznych

- Podłoże agarowe BHI z dodatkiem Tween 80 oraz CaCl₂
- Podłoże agarowe BHI z dodatkiem żółtka jaja kurzego

3.2.4.3. Podłoża do oznaczania lekowrażliwości

- Podłoże Mueller-Hinton II Agar (Liofilchem)

3.2.4.4. Podłoża zastosowane do hodowli szczepów przed procedurą izolacji DNA i RNA

- Podłoże płynne BHI

3.2.5. Odczynniki, bufony oraz gotowe zestawy

3.2.5.1. Odczynniki do prób biochemicznych

- Wykrywanie koagulazy: osocze królicze (IBSS Biomed) rozcieńczone 0,9% NaCl w proporcji 1:5
- Wykrywanie czynnika skupiania (Clumping Factor, CF): osocze królicze (IBSS Biomed) nierozcieńczone

3.2.5.2. Krążki i paski antybiogramowe do oznaczania lekowrażliwości metodą dyfuzyjno-krążkową (Oxoid)

- Oksacylina 1 µg
- Benzylpenicylina 1 U
- Ciprofloksacyna 5 µg
- Norfloksacyna 10 µg
- Gentamicyna 10 µg
- Erytromycyna 15 µg
- Klindamycyna 2 µg
- Tetracyklina 30 µg
- Tigecyklina 15 µg
- Chinupristyna/Dalfopristyna 15 µg
- Linezolid 10 µg
- Rifampicyna 5 µg
- Sulfametoksazol/trimetoprim 25 µg
- Kwas fusydowy 10 µg
- Paski E-test Wankomycyna (MIC Test Strip, Liofilchem)
- Paski E-test Daptomycyna (MIC Test Strip, Liofilchem)

3.2.5.3. Odczynniki i materiały wykorzystane w badaniach genetycznych

3.2.5.3.1. Odczynniki do izolacji DNA

W celu izolacji genomowego DNA badanych szczepów zastosowano zestaw Genomic Micro AX Staphylococcus Gravity (A&A Biotechnology) składający się z:

- Bufor do zawieszania bakterii (BS)
- Lizostafina
- Bufor lizujący (LSU)
- Proteinaza K
- Roztwór równoważący (K1)
- Pierwszy bufor płuczący (W1G)

- Drugi bufor płuczający (W2)
- Bufor elucyjny (E)
- Bufor zobojętniający (N)

W trakcie izolacji postępowano zgodnie z instrukcją producenta.

3.2.5.3.2. Odczynniki do klasycznej reakcji PCR

- PCR Mix Plus (A&A Biotechnology) zawierający antyinhibitor reakcji PCR i polimerazę DNA Taq, 2x stężony
- Woda wolna od nukleaz (A&A Biotechnology)
- Startery właściwe dla określonej reakcji (Genomed S.A.)

3.2.5.3.3. Odczynniki do elektroforezy w żelu agarozowym

W trakcie badań przygotowywano żele agarozowe o stężeniu od 1 do 2%, uwzględniając wielkości oczekiwanych prążków.

- 1) 1-2% żel agarozowy:
 - Agaroz (Sigma-Aldrich) 1 – 2 g
 - Bufor TAE (Tris-Octan-EDTA; rozcieńczony 50x; Thermo Scientific) 100 ml
 - Barwnik Midori Green (NIPPON Genetics Europe GmbH) 1,5 µl
- 2) Markery wielkości DNA (A&A Biotechnology)
 - DNA Marker 1 (100-1000 pz)
 - DNA Marker 2 (50-1000 pz)
 - DNA Marker 3 (100-3000 pz)

3.2.6. Aparatura

- zamrażarka niskotemperaturowa MDF-DU300H-PE (Panasonic)
- vortex Mixer (Labnet)
- waga analityczna WPS 510/C (RADWAG)
- densytometr DEN-1 (Biosan)
- mikrowirówka laboratoryjna MPW-52
- inkubator z wytrząsaniem ES-20/80 (Biosan)
- spektrofotometr Genova Nano (Jenway)
- termomikser TS-100 (Biosan)
- termocykler T Professional Basic Thermocycler Gradient (Biometra)
- zestaw do elektroforezy horyzontalnej Bio-Rad Sub-Cell GT (BioRad) oraz Bio-Rad Power Pac 200 power supply (Bio-Rad)
- kamera UV (Syngen)

3.2.7. Programy komputerowe

- Scion Image (Syngen) – oprogramowanie do wizualizacji i archiwizacji zdjęć rozdziałów elektroforetycznych
- MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 11 (oprogramowanie open source) – program wykorzystywany przy opracowaniu analiz molekularnych
- *pubmlst.org* – oprogramowanie wykorzystane w celu typowania sekwencji multilocus (ang. *Multi-Locus Sequence Typing*, MLST)
- geoBURST 1.2.1 – program umożliwiający stworzenie drzewa filogenetycznego oraz wizualizację powiązań między typami sekwencji

4. Metody

4.1. Rodzaj *Streptococcus*

4.1.1. Hodowla szczepów badanych

Po uprzednim rozmrożeniu szczepów przechowywanych w -80°C odsiewano je na podłoża wymienione w podrozdziale 3.1.4.1. i inkubowano w temperaturze 37°C przez 24 godziny.

4.1.2. Postępowanie identyfikacyjne

4.1.2.1. Identyfikacja metodami fenotypowymi szczepów badanych wyizolowanych z mleka krów z zapaleniem wymion

4.1.2.1.1. Klasyczna identyfikacja mikrobiologiczna

Próbki mleka pobierane były przez weterynarzy z powiatu sieradzkiego po stwierdzeniu klinicznego lub subklinicznego zapalenia wymion, a następnie przekazywane autorce pracy do badań identyfikacyjnych.

Przebadano 660 próbek mleka krowiego. Próbki posiewano na podłoża: krwawe, MacConkeya oraz Baird-Parkera i oceniano czystość otrzymanych hodowli. Na podłożu krwawym poszukiwano kolonii bakterii katalazoujemnych. Następnie przesiewano je na świeże podłoża i oceniano mikroskopowo obecność komórek bakterii gramdodatnich. Bakterie gramdodatnie, katalazoujemne posiewano następnie na podłoża agarowe oraz podłoża z żółcią i eskuliną w celu wykluczenia obecności bakterii z rodzaju *Enterococcus*. W dalszych etapach identyfikacji uwzględniano katalazoujemne, gramdodatnie bakterie nie wyrastające na podłożach agarowych oraz z żółcią i eskuliną.

4.1.2.1.2. Identyfikacja z wykorzystaniem gotowych zestawów testów biochemicznych

Katalazoujemne, gramdodatnie bakterie nie wyrastające na podłożach agarowych oraz z żółcią i eskuliną podejrzewano o przynależność do rodzaju *Streptococcus*. Identyfikację do gatunku przeprowadzano z użyciem komercyjnych testów identyfikacyjnych API 20 Strep, uwzględniających właściwości biochemiczne istotne w procesie identyfikacji i różnicowania gatunków rodzaju *Streptococcus*. Do badań z zastosowaniem testów API 20 Strep badane szczepy posiewano na podłoża krwawe i inkubowano 24 godziny, w warunkach tlenowych, w temperaturze 37°C i postępowano zgodnie z instrukcją producenta. Otrzymane wyniki analizowano przy pomocy bazy danych *apiweb*.

4.1.2.2. Identyfikacja genetyczna

Identyfikację fenotypową wszystkich badanych szczepów paciorkowców potwierdzano metodą genetyczną. W celu określenia przynależności do rodzaju *Streptococcus* przeprowadzono łańcuchową reakcję PCR z użyciem starterów strep-spp-F i strep-spp-R. W drugim etapie przeprowadzono identyfikację genetyczną pozwalającą na przypisanie izolatu do gatunku. Sekwencje użytych starterów oraz wielkości oczekiwanych ampliconów przedstawiono w Tabeli 1.

Tabela 1. Startery użyte w procesie identyfikacji genetycznej.

Identyfikowany takson	Nazwa startera	Sekwencja (5'-3')	Wielkość ampliconu	Źródło
<i>Streptococcus</i> sp.	strep-spp-F	CGGGGGATAACTATTGGAAACGATA	912 pz	(Arafa et al., 2021)
	strep-spp-R	ACCTGTCACCCGATGTACCGAAGTA		
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	sdys-F	GTGCAACTGCATCACTATGAG	279 pz	(Raemy et al., 2013)
	sdys-R	CGTCACATGGTGGATTTTC		
<i>Streptococcus uberis</i>	pauA-F	TGATTCCGACTACTACGCTAGAT	723 pz	
	pauA-R	ATACTTTGAGTTTCACCGAGTTC		
<i>Streptococcus parauberis</i>	spa2152-F	TTCGCTCTGAGGCAATGTTG	718 pz	(Raissy et al., 2016)
	spa2870-R	GCTTCATATATCGCTATACT		
<i>Streptococcus gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	tanB-F	TGGTCAAGCTCAGACCAAT	362 pz	(Hatrongjit et al., 2017)
	tanB-R	TACACAAGCCAGACGGTTCC		
<i>Streptococcus gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i>	sgp-F	GGTGTGCCAGATGGACAAGA	531 pz	
	sgp-R	CGTTACCGTTGTTCCGCTTG		

Kontrole dodatnie stanowiły następujące szczepy:

- *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615
- *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* ATCC 12394
- *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* NCTC 4669
- *Streptococcus uberis* DSM 20569
- *Streptococcus parauberis* DSM 6632
- *Streptococcus gallolyticus* ZMF SV107
- *Streptococcus gallolyticus* ZMF SV901

4.1.2.2.1. Sekwencjonowanie genów w celu identyfikacji szczepów *S. dysgalactiae* do podgatunku

W celu identyfikacji badanych szczepów *S. dysgalactiae* do podgatunku sekwencjonowano gen 16S rRNA z użyciem starterów LPW57 i LPW58 (Kosecka-Strojek et al., 2020), a następnie uzyskane sekwencje porównywano z sekwencjami genów 16S rRNA szczepów wzorcowych. Ww. sekwencje genów szczepów wzorcowych pozyskano z bazy GenBank.

4.1.3. Analiza cech badanych szczepów metodami fenotypowymi

4.1.3.1. Określanie typu hemolizy

Badane szczepy posiewano redukcynicznie na podłoża krwawe i inkubowano w temperaturze 37°C przez 24 godziny. Pojawienie się całkowitego przejaśnienia podłoża wokół kolonii badanego szczepu klasyfikowano jako hemolizę β . Częściowe przejaśnienie podłoża z zazielenieniem identyfikowano jako hemolizę α .

4.1.3.2. Określanie właściwości biochemicznych

4.1.3.2.1. Zdolność do wytwarzania proteaz

4.1.3.2.1.1. Wykrywanie żelatynazy

Zdolność do wytwarzania żelatynazy badano na podłożu BHI z dodatkiem 15% żelatyny. Szczepy posiewano do podłoża o temperaturze 37°C i inkubowano 48 godzin w tej samej temperaturze. Następnie ochładzano próbki do temperatury ok. 15°C. Trwałe upłynnienie i brak ponownego zestalenia świadczyły o zdolności wytwarzania enzymu. Kontrolę dodatnią dla obecności żelatynazy stanowił szczep *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

4.1.3.2.1.2. Wykrywanie kazeinazy

Zdolność do wytwarzania kazeinazy badano na podłożu agarowym z dodatkiem BHI oraz 10% odtłuszczonego mleka krowiego. Posiewy inkubowano w temperaturze 37°C przez 48 godzin. O wyniku dodatnim – wytwarzaniu kazeinazy rozkładającej białko mleka - świadczyło pojawienie się przejaśnienia wokół kolonii badanego szczepu. Kontrolę dodatnią stanowił szczep *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228.

4.1.3.2.2. Zdolność do wytwarzania lipaz

4.1.3.2.2.1. Wykrywanie lecytynazy

Zdolność do wytwarzania fosfolipazy badano na podłożu agarowym z dodatkiem BHI oraz żółtka jaja kurzego. Posiewy inkubowano w temperaturze 37°C przez 48 godzin. Występowanie zmętnienia wokół linii posiewu świadczyło o obecności lecytynazy u badanego szczepu. Kontrolę dodatnią dla obecności lecytynazy stanowił szczep *Bacillus cereus* PCM 1948.

4.1.3.2.2. Wykrywanie esterazy

Zdolność do wytwarzania esteraz badano na podłożu zawierającym Tween 80 i chlorek wapnia. Posiewy inkubowano w temperaturze 37°C przez 48 godzin. Uwolnione dzięki esterażom kwasy tłuszczowe tworzą z jonami wapnia nierozpuszczalne sole. Kontrolę dodatnią dla obecności esterazy stanowił szczep *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

4.1.3.2.3. Zdolność do rozkładu cukrów

Zdolność do rozkładu cukrów (fruktoza, glukoza, laktoza, sorbitol) badano na podłożach płynnych z dodatkiem 50% surowicy bydlęcej i 0,2% roztworu czerwieni fenolowej w 50% etanolu zawierających badany cukier. Posiewy inkubowano w temperaturze 37°C przez 48 godzin. Zmiana zabarwienia z czerwonego na żółte świadczyła o rozkładzie badanego cukru przez badany szczep. Kontrolę dodatnią dla rozkładu fruktozy i glukozy stanowił szczep *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, dla rozkładu laktozy szczep *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615, dla rozkładu sorbitolu szczep *Streptococcus uberis* DSM 20569.

4.1.3.3. Określanie zdolności do tworzenia biofilmu

Szczepy badane analizowano pod kątem zdolności do tworzenia biofilmu z użyciem metody Christensena i wsp. z modyfikacjami (Christensen et al., 1985). Ze świeżych hodowli szczepów badanych na podłożach krwawych przygotowywano zawiesiny 0,5 w skali McFarlanda. Następnie do probówek zawierających 2 ml bulionu TSB z dodatkiem 1% glukozy dodawano 100 µl przygotowanych zawiesin. Tak przygotowane hodowle inkubowano 24 godziny w temperaturze 37°C. Po okresie inkubacji przenoszono po 200 µl hodowli w trzech powtórzeniach do płytki 96-dołkowej. Kontrolę ujemną stanowił jałowy bulion TSB z dodatkiem 1% glukozy. Płytki 96-dołkowe inkubowano przez 48 godzin w temperaturze 37°C. Po inkubacji z dołków płytki usuwano pipetą nadmiar hodowli, przepłukiwano trzykrotnie 200 µl buforu PBS i inkubowano płytkę przez jedną godzinę w temperaturze 60°C. Po inkubacji do każdego z dołków dodawano 100 µl 1% roztworu fioletu krystalicznego na dwie minuty. Następnie roztwór fioletu usuwano i przepłukiwano dołki trzykrotnie 200 µl wody i pozostawiano do wyschnięcia. Następnie do dołków płytki dodawano po 200 µl roztworu stanowiącego mieszaninę 10% metanolu i 7,5% kwasu octowego w wodzie. Płytkę krótko wytrząsano a następnie mierzono absorbancję przy 540 nm przy pomocy czytnika płytek EPOCH (BioTek). Z wartości trzech powtórzeń wyliczano średnią. Wartość absorbancji do określenia zdolności tworzenia biofilmu obliczano jako różnicę wartości średniej wyników otrzymanych dla badanego szczepu i wartość średnią absorbancji dla kontroli ujemnej. Następnie oceniano zdolność wobec następującej skali:

- < 0,1 brak zdolności tworzenia biofilmu,
- 0,1 – 0,199 słaba zdolność do tworzenia biofilmu,

- 0,2 – 0,299 umiarkowana zdolność do tworzenia biofilmu,
- $\geq 0,3$ silna zdolność do tworzenia biofilmu.

4.1.3.4. Określanie zdolności szczepów do wyrastania w surowicy

Szczepy badane posiewano na podłoża Columbia Agar i inkubowano 24 godziny. Ze świeżych hodowli szczepów badanych na podłożach krwawych przygotowywano zawiesiny 0,5 w skali McFarlanda. Na płytkach 96-dołkowych przygotowywano rozcieńczenia surowic ludzkiej i bydlęcej (5,10 i 50%). Pojedyncza próba badana składała się z:

- Zawiesiny bakteryjnej 10 μ l
- Surowicy ludzkiej lub bydlęcej odpowiednio 10, 20, 100 μ l
- Bulionu Todd-Hewitt do objętości 200 μ l

Badanie dla każdego szczepu (dla każdego z trzech przygotowywanych rozcieńczeń określonego rodzaju surowicy) przeprowadzano w trzech powtórzeniach. Po przygotowaniu płytki 96-dołkowej dokonywano pomiarów spektrofotometrycznych przy długości fali 600 nm przy użyciu czytnika płytek EPOCH (BioTek). Ustalono sześć punktów pomiarowych odpowiadających 1, 2, 3, 4, 22 i 25 godzinie inkubacji. Z wartości trzech powtórzeń badanego szczepu dla jednego stężenia określonego rodzaju surowicy wyliczano średnią.

4.1.3.5. Badanie aktywności streptokinazy wobec plazminogenu ludzkiego i bydlęcego

4.1.3.5.1. Izolacja streptokinazy

Badane szczepy hodowano przez 24 godziny w temperaturze 37°C w bulionie Todd-Hewitt (50 ml). Następnie pobierano 1 ml hodowli każdego szczepu, przenoszono do 50 ml bulionu Todd-Hewitt i inkubowano ponownie 18 godzin w temperaturze 37°C. Po inkubacji hodowle badanych szczepów wirowano przez 30 minut przy 10 000 obrotów/min., a następnie sączono supernatant przez filtry o średnicy porów 0,22 μ m w celu usunięcia pozostałości komórek bakteryjnych. Otrzymany przesącz stanowił źródło surowego enzymu – streptokinazy.

4.1.3.5.2. Metoda jakościowa

Do jakościowego badania obecności i aktywności streptokinazy zastosowano podłoże będące 1% roztworem agarozy w buforze TAE z 5% dodatkiem odtłuszczonego mleka krowiego. W podłożu wycinano studzienki, do których dodawano mieszaninę 10 μ l otrzymanego filtratu oraz 10 μ l plazminogenu, odpowiednio ludzkiego i bydlęcego, w stężeniu 1mg/ml rozpuszczonego w buforze 150 mM NaCl i 50 mM Tris-HCl (pH=7,4). Kontrolę ujemną stanowił bulion Todd-

Hewitt. Jako kontroli dodatniej użyto szczepu *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* ATCC 12449 (H64A). Podłoża inkubowano w temperaturze 37°C przez 24 godziny. Zdolność szczepu do wytwarzania streptokinazy wiążącej określony rodzaj plazminogenu manifestowała się jako strefa przejaśnienia wokół studzienki.

4.1.3.5.3. Metoda ilościowa

Zdolność do aktywacji plazminogenu do plazminy przez streptokinazę obecną u badanych szczepów badano z wykorzystaniem 96-dołkowych płytek. Do każdego testu dodawano:

- 7,5 µl mieszaniny filtratu z odpowiednim plazminogenem, ludzkim lub bydlęcym, w stosunku 1:1,
- 7,5 µl 0,9% NaCl,
- 60 µl Tris-HCl (50 mM, pH=8,2),
- 15 µl roztworu substratu chromogenego Chromozym.

Roztwór substratu chromogenego przygotowano poprzez rozpuszczenie 5 mg substratu chromogenego w 2,63 ml 100 mM roztworu glicyny. W kontroli ujemnej filtrat zastąpiono wodą. Następnie w odstępach czasu co 10 minut mierzono absorbancję przy 405 nm przy użyciu czytnika płytek EPOCH (BioTeK). Obliczano zmianę absorbancji w czasie ($\Delta A/min$), wykorzystując metodę regresji liniowej z przynajmniej siedmiu punktów pomiarowych, gdzie współczynnik korelacji analizowanych danych był nie mniejszy niż 0,95. Następnie obliczano aktywność streptokinazy zgodnie ze wzorem:

$$\text{Aktywność próbki [U/ml]} = \frac{V}{v\epsilon d} \times \Delta A/min$$

gdzie,

V – całkowita objętość (90 µl)

v – objętość próbki (filtrat+plazminogen = 7,5 µl)

ϵ – molowy współczynnik absorpcji dla 4–nitroaniliny przy 405 nm
wynoszący 10,40 mmol⁻¹×l×cm⁻¹

d – ścieżka światła w studziencie płytki 96-dołkowej (0,17 cm)

4.1.4. Metody zastosowane w badaniach molekularnych

4.1.4.1. Hodowla szczepów

Szczepy badane odsiewano po odmrożeniu na podłoża krwawe. Następnie przesiewano szczepy badane na podłoża płynne Todd-Hewitt i inkubowano

w temperaturze 37°C przez 18 godzin przy użyciu inkubatora z wytrząsaniem ES-20/80 (Biosan).

4.1.4.2. Izolacja kwasów nukleinowych

4.1.4.2.1. Izolacja DNA

Izolację bakteryjnego DNA przeprowadzano zgodnie z protokołem izolacji dla zestawu Genomic Micro AX Bacteria Gravity (A&A Biotechnology). Po procesie izolacji stężenie DNA sprawdzono przy użyciu spektrofotometru Genova Nano (Jenway). Wyizolowane DNA przechowywano w szczelnie zamkniętych probówkach Eppendorf i przechowywano w temperaturze +4°C.

4.1.4.2.2. Izolacja RNA

Izolację RNA prowadzono zgodnie z protokołem izolacji dla zestawu GeneJET RNA Purification Kit (Thermo Scientific). Próbkę zabezpieczono przez działaniem RNaz dzięki zastosowaniu 1 µl inhibitora RNaz do każdej próbki. Po zakończeniu izolacji mierzono stężenie RNA.

4.1.4.3. Łańcuchowa reakcja polimerazy

Reakcje PCR prowadzono w celu identyfikacji badanych drobnoustrojów, potwierdzenia obecności genów i sekwencjonowania określonych fragmentów DNA, poszukiwania wybranych czynników kolonizacji i chorobotwórczości, poszukiwania genów oporności na antybiotyki.

Skład mieszaniny reakcyjnej w klasycznej wersji PCR był następujący:

- PCR Mix Plus 5 µl
 - Starter 1 (F-forward) 0,2 µl
 - Starter 2 (R-reverse) 0,2 µl
 - Woda wolna od nukleaz 3,6 µl
 - Matryca DNA 1 µl
- razem 10 µl

W przypadku przeprowadzania reakcji Multiplex PCR skład mieszaniny reakcyjnej był następujący:

- PCR Mix Plus 10 µl
 - Startery – każdy w objętości 0,2 µl
 - Woda wolna od nukleaz do 19 µl
 - Matryca DNA 1 µl
- razem 20 µl

Kontrolę ujemną we wszystkich przeprowadzanych reakcjach stanowiła mieszanina reakcyjna, gdzie zamiast matrycy dodawano 1 µl wody wolnej od nukleaz. Kontrole dodatnie stanowiły wymienione szczepy wzorcowe. W celu obliczania ilości potrzebnej mieszaniny uwzględniano liczbę próbek badanych, kontrole dodatnie, kontrolę ujemną oraz 10% nadmiar ze względu na możliwe straty w czasie pipetowania. Warunki prowadzonych reakcji były zmienne i zależały od temperatur topnienia zastosowanych starterów.

W Tabeli 2, 3 i 4 przedstawiono sekwencje starterów wykorzystanych w badaniach molekularnych.

Tabela 2. Startery zastosowane do wykrywania genów warunkujących kolonizację.

Nazwa genu	Kodowany czynnik/cecha	Nazwa startera	Seqwencja (5'-3')	Wielkość amplikonu	Pochodzenie sekwencji	Źródło		
<i>cbp</i>	białko wiążące kolagen	cbp-F	GACAAACTCTGGAGAACTCA	240 pz	<i>S. dysgalactiae</i>	(Lo & Cheng, 2015)		
		cbp-R	TCTGTTGTCAAACCAAGTTGG					
<i>fbp</i>	białko wiążące fibronektynę	fbp-F	AATCGCAAGAGATCCTACGC	780 pz				
		fbp-R	AGTTGGTAAGCACTGTCAGC					
<i>gapC</i>	dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego	gapC-F	GGACGTCTGCATTCCGTC	223 pz				
		gapC-R	TTCTGGATCACGTTCAAGCAG					
<i>hylB</i>	hialuronidaza	hylB-F	GCCTCTGAACAGCAATTAAC	703 pz				
		hylB-R	CATAGCAGGGTTCGATACGC					
<i>isp1</i>	udział w tworzeniu biofilmu, białko immunogenne	isp1-F	CAACTGAAAAAACCCAGAGCC	429 pz			<i>S. pyogenes</i>	(Jordal et al., 2015)
		isp-R	GGTTGAAGTCAAAGGCACCATAA					
<i>lmb</i>	białko wiążące lamininę	lmb-F	AACCCCAAACAGCCTACGCAAG	375 pz				
		lmb-R	TAAAACGGGATCCGTCAGGTAT					
<i>prtF1</i>	białko wiążące fibronektynę	prtF1-F	TATCAAAAATCTTCTAAGTGCTGAG	930 pz				
		prtF1-R	AATGGAACTACTTTCGGACGGG					
<i>prtF2</i>	białko wiążące fibronektynę	prtF2-F	ATAGGATTGTCCGGAGTATCA	2000 pz				
		prtF2-R	TTATGTTGCTTCTCACCA					
<i>sla</i>	fosfolipaza A2	sla-F	CTCTAATAGCATCGGCTACGC	440 pz				
		sla-R	AATGGAAAATGGCACTGAAAG					
<i>mtuA</i>	antygeny receptora lipoproteinowego	mtuA-F	GAACCGCTACCTGAGGATGT	500 pz	<i>S. uberis</i>	(Boonyayatra et al., 2018)		
		mtuA-R	ATTTGATCCGGTGTTCCTTC					
<i>sua</i>	cząsteczka adhezyjna SUAM	sua-F	ACGCAAGGTGCTCAAGAGTT	776 pz				
		sua-R	TGAACAAGCGATTTCGTCAG					

Tabela 3. Startery zastosowane do wykrywania genów kodujących czynniki inwazyjne.

Nazwa genu	Kodowany czynnik/cecha	Nazwa startera	Sekwencja (5'-3')	Wielkość ampliconu	Pochodzenie sekwencji	Źródło		
<i>ska</i>	streptokinaza	ska-F	CGATCAAAGGGATCATACGG	598 pz	<i>S. pyogenes</i>	(Rato et al., 2011)		
		ska-R	AGGTTACAGTAACGACGGC					
<i>sagA</i>	streptolizyna S	sagA-F	TACTTCAAATATTTTAGCTACT	487 pz				
		sagA-R	GATGATACCCCGATAAGGATAA					
<i>slo</i>	streptolizyna O	slo-F	ACGGCAGCTCTTATCATT	600 pz				
		slo-R	GACCTCAACCGTTGCTTTGT					
<i>scp</i>	peptydaza C5a układu dopełniacza	scp-F	CCAAGACTTCAGCCACAAGG	591 pz				
		scp-R	CAATTCCAGCCAATAGCAGC					
<i>sicG</i>	paciorkowcowy inhibitor dopełniacza	sicG-F	AGTAAAACACTACTATTTACA	190 pz			<i>S. dysgalactiae</i>	(Lo & Cheng, 2015)
		sicG-R	AGTCATATGGCCAATCTT					
<i>dppA</i>	permeaza dipeptydowa	dppA-F	CCGTTATGGAGTCCACAATGAA	1045 pz	<i>S. pyogenes</i>	(Rato et al., 2011)		
		dppA-R	ACTAGCTTTGAGTTTAATAGTAATC					
<i>sdn</i>	streptodornaza	sdn-F	ACCCCATCGGAAGATAAAGC	489 pz				
		sdn-R	AACGTTCAACAGGCGCTTAC					
<i>spd1</i>	paciorkowcowa DNaza I	spd1-F	CCCTTCAGGATTGCTGTCAT	400 pz				
		spd1-R	ACTGTTGACGCAGCTAGGG					

Tabela 4. Startery zastosowane do wykrywania genów oporności.

Nazwa genu	Kodowana oporność na antybiotyki	Nazwa startera	Sekwencja (5'-3')	Wielkość amplikonu	Źródło
<i>pbp2b</i>	penicyliny	pbp2b-F	GATCCTCTAAATGATTCTCAGGTGG	1500 pz	(Zhang et al., 2021)
		pbp2b-R	CCATTAGCTTAGCAATAGGTGTTGG		
<i>tetK</i>	tetracykliny	tetK-F	TCCTGGAACCATGAGTGT	189 pz	(Jeric et al., 2002)
		tetK-R	AGATAATCCGCCATAAC	993 pz	
tetL-F		TGAACGTCTCATTACCTG	740 pz		
tetL-R		ACGAAAGCCACCTAAAA			
<i>tetM</i>		tetM-F	GAACTCGAACCAAGAGGAAAAGC	515 pz	(Zhang et al., 2021)
		tetM-R	ATGGAAGCCCAGAAAAGGAT		
<i>tetO</i>		tetO-F	AACTTAGGCATTCTGGCTCAC	667 pz	(Kaczorek et al., 2017)
		tetO-R	TCCCACTGTTCCATATCGTCA		
<i>tetS</i>		tetS-F	CATAGACAAGCCGTTGACC	421 pz	(Zhang et al., 2021)
		tetS-R	ATGTTTTTGGAACGCCAGAG		
<i>ermA</i>	makrolidy, linkozamidy, streptograminy B	ermA-F	GTTCAAGAACAATCAATACAGAG	294 pz	(Kaczorek et al., 2017)
		ermA-R	GGATCAGGAAAAGGACATTTTAC		
<i>ermB</i>		ermB-F	ATTGGAACAGGTAAAGGGC	530 pz	
		ermB-R	GAACATCTGTGGTATGGCG		
<i>ermC</i>		ermC-F	ATCTTTGAAATCGGCTCAGG	348 pz	(Zhang et al., 2021)
		ermC-R	CAAACCCGTATTCCACGATT		
<i>ermTR</i>		ermTR-F	ATAGAAATTGGGTCAGGAAAAGG	475 pz	(Kaczorek et al., 2017)
		ermTR-R	CCCTGTTTACCCATTTATAAACG		
<i>mefA</i>	makrolidy	mefA-F	AGTATCATTAATCACTAGTGC	323 pz	(Kaczorek et al., 2017)
		mefA-R	TTCTTCTGGTACTAAAAGTGG		
<i>lnuA</i>	linkozamidy	lnuA-F	GGTGGCTGGGGGGTAGATGTATTAAGTGG	567 pz	(Shi et al., 2023)
		lnuA-R	GCTCTCTTTGAAATACATGGTATTTTTCGATC		
<i>lnuD</i>		lnuD-F	ACGGAGGGATCACATGGTAA	496 pz	
		lnuD-R	TCTCTCGCATAATAACCTTACGTC		
<i>parC</i>	fluorochinolony	parC-F	CTGAATGCCAGCGCCAAAT	978 pz	(Kaczorek et al., 2017)
		parC-R	GCGCATACGCACTGAACC		
<i>gyrA</i>		gyrA-F	CGATGTCGGTCATTGTTG	848 pz	
		gyrA-R	ACTCCGTCAGGTTGTGC		
<i>aad-6</i>	aminoglikozydy	aad-6-F	AGAAGATGTAATAATATAG	978 pz	(Kaczorek et al., 2017)
		aad-6-R	CTGTAATCACTGTTCCCGCCT		
<i>aphA</i>		aphA-F	GGGGTACCTTTAAATACTGTAG	848 pz	
		aphA-R	TCTGGATCCTAAAACAATTCATCC		

4.1.4.4. Łańcuchowa reakcja polimerazy w czasie rzeczywistym

4.1.4.4.1. Synteza pierwszej nici cDNA

Syntezę pierwszej nici cDNA przeprowadzano zgodnie z instrukcją producenta zestawu TranScriba Kit (A&A Biotechnology). Mieszanina reakcyjna składała się z matrycowego RNA, heksamerów oraz wody wolnej od nukleaz. Mieszaninę przygotowywaną dla RNA każdego badanego szczepu inkubowano przez pięć minut w temperaturze 65°C. Następnie po umieszczeniu probówek w lodzie dodawano kolejne składniki: bufor reakcyjny, inhibitor RNaz, mieszaninę deoksyrybonukleotydów oraz odwrotną transkryptazę. Przeprowadzano trzy następujące po sobie inkubacje: 5-minutową w temperaturze 25°C, 60-minutową w temperaturze 42°C, 5-minutową w temperaturze 70°C. Otrzymane pierwsze nici cDNA badanych szczepów przechowywano do czasu badania Real-time PCR w temperaturze -20°C.

4.1.4.4.2. Reakcje Real-time PCR

Reakcje Real-time PCR przeprowadzano przy użyciu gotowej mieszaniny RT PCR Mix SYBR (A&A Biotechnology). Wykorzystano startery opisane wcześniej do poszukiwania genów: streptokinazy (*ska*), peptydazy C5a układu dopełniacza (*scp*), fosfolipazy A2 (*sla*), paciorkowcowego inhibitora dopełniacza (*sicG*).

Skład mieszaniny reakcyjnej w reakcji Real-time PCR obejmował:

- RT PCR Mix SYBR
- Starter 1 (F-forward)
- Starter 2 (R-reverse)
- Woda wolna od nukleaz
- cDNA

Ilości użytych substratów uzależnione były od uzyskanego stężenia RNA w czasie izolacji. Każda reakcja wykonywana była w dwóch powtórzeniach. Próbę kontrolną stanowiła mieszanina, w której cDNA zastępowano wodą wolną od nukleaz. Dla każdej badanej próbki określonego szczepu wykonywano kontrolę dodatnią, wykorzystując w tym celu startery kodujące geny metabolizmu podstawowego (Tabela 5).

Tabela 5. Startery kodujące geny metabolizmu podstawowego.

Nazwa genu metabolizmu podstawowego	Gatunek drobnoustroju	Nazwa startera	Sekwencja (5'-3')	Wielkość amplikonu	Źródło
<i>gki</i>	<i>S. uberis</i>	gkiSU-F	GACCGGACCCAAAACACAGTCACAGGTGCTTTT	564 pz	(Jolley et al., 2018)
		gkiSU-R	AAGAGAATCTGGATTAGGATATTTGAAATATT		
<i>gki</i>	<i>S. dysgalactiae</i>	gkiSD-F	GGAATTGGTATGGGATCACCAGGAGC	498 pz	(McMillan et al., 2010)
		gkiSD-R	AATTCTCCTGCTGCTGACAC		
<i>p20</i>	<i>S. gallolyticus</i>	p20SG-F	TATTTACGCCACGTCTG	493 pz	(Jolley et al., 2018)
		p20SG-R	CATAGCGCAATAGGTCAC		

Dla badanej próbki wykonywano szereg rozcieńczeń matrycowego cDNA oraz sporządzano krzywą kalibracyjną. Stosowane programy składały się z następujących etapów:

- Wstępna denaturacja 95°C
- 40 cykli obejmujących:
 - Denaturację 95°C, 15 sekund
 - Przyłączanie starterów (zależne od temperatury topnienia ustalonej na podstawie krzywej topnienia) 30 sekund
 - Odczyt fluorescencji
 - Elongację 72°C, 30 sekund

4.1.4.5. Elektroforeza w żelu agarozowym

Produkty reakcji PCR rozdzielano w 1 – 2% żelu agarozowym, do którego dodawano 1,5 µl barwnika Midori Green (NIPPON Genetics Europe GmbH). W zależności od oczekiwanych wielkości produktów reakcji PCR używano następujących markerów wielkości DNA: DNA Marker 1 (100-1000 pz), DNA Marker 2 (50-1000 pz), DNA Marker 3 (100-3000 pz) (A&A Biotechnology). Rozdział elektroforetyczny prowadzono przez 60 minut przy stałym napięciu 70V. Wyniki wizualizowano z użyciem kamery UV i archiwizowano w postaci zdjęć żeli.

4.1.5. Określanie profilu lekowrażliwości metodą dyfuzyjno-krażkową

Lekowrażliwość badanych szczepów bakterii oceniano metodą dyfuzyjno-krażkową zgodnie z rekomendacjami EUCAST (Europejski Komitet ds. Oznaczenia Lekowrażliwości, ang. *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*) – wersja 13.0 (EUCAST, 2023). Szczepem kontrolnym był *S. pneumoniae* ATCC 49619. W badaniach szczepów *S. dysgalactiae* i *S. uberis* wykorzystano krążki rekomendowane dla grup A, B, C i G paciorkowców:

- Benzylpenicylina 1U
- Norfloksacyna 10 µg
- Wankomycyna 5 µg
- Erytromycyna 15 µg
- Klindamycyna 2 µg
- Tetracyklina 30 µg
- Tigecyklina 15 µg
- Linezolid 10 µg
- Rifampicyna 5 µg
- Sulfametoksazol z trimetoprimem 25 µg

W celu określenia lekowrażliwości szczepów *S. gallolyticus* postępowano zgodnie z rekomendacjami EUCAST dla grupy Viridans paciorkowców:

- Benzylpenicylina 1U
- Ampicylina 2 µg
- Cefepim 30 µg
- Cefuroksym 30 µg
- Wankomycyna 5 µg
- Klindamycyna 2 µg

Ponadto dla szczepów *S. gallolyticus* określano lekowrażliwość wobec:

- Norfloksacyna 10 µg
- Erytromycyna 15 µg
- Tetracyklina 30 µg
- Rifampicyna 5 µg

Szczepy badane hodowano na podłożu krwawym. Przygotowywano zawiesiny 0,5 w skali McFarlanda w 0,9% NaCl. Zawiesiny posiewano wacikiem w postaci murawy na podłoża Mueller-Hinton z dodatkiem 5% krwi końskiej i 20mg/L β-NAD, układano ww. krążki antybiogramowe i inkubowano w temperaturze 37°C przez 20 godzin. Interpretacji dokonywano w oparciu o aktualne rekomendacje EUCAST wersja 13.0 (EUCAST, 2023). Dla szczepów *S. gallolyticus* w celu oceny lekowrażliwości wobec norfloksacyny, erytromycyny, tetracykliny oraz rifampicyny uwzględniono strefy graniczne dla szczepów grup A, B, C i G.

4.2. Rodzaj *Staphylococcus*

4.2.1. Hodowla szczepów badanych

Po uprzednim rozmrożeniu szczepów przechowywanych w -80°C odsiewano je na podłoża wymienione w podrozdziale 3.2.4.1 i inkubowano w temperaturze 37°C przez 24 godziny.

4.2.2. Badanie cech badanych szczepów metodami fenotypowymi

4.2.2.1. Określanie typu hemolizy

Szczepy posiewano redukcyjnie na podłoża Columbia Agar z dodatkiem 5% odwłóknionej krwi baraniej i inkubowano w temperaturze 37°C przez 24 godziny. Pojawienie się całkowitego przejaśnienia podłoża wokół kolonii badanego szczepu klasyfikowano jako hemolizę β .

4.2.2.2. Określanie właściwości biochemicznych

4.2.2.2.1. Zdolność do wytwarzania proteaz

4.2.2.2.1.1. Wykrywanie żelatynazy

Badanie przeprowadzono w sposób opisany w podrozdziale 4.1.4.1.1.

4.2.2.2.1.2. Wykrywanie kazeinazy

Badanie przeprowadzono w sposób opisany w podrozdziale 4.1.4.1.2.

4.2.2.2.2. Zdolność do wytwarzania lipaz

4.2.2.2.2.1. Wykrywanie lecytynazy

Badanie przeprowadzono w sposób opisany w podrozdziale 4.1.4.2.1.

4.2.2.2.2.2. Wykrywanie esterazy

Badanie przeprowadzono w sposób opisany w podrozdziale 4.1.4.2.2.

4.2.3. Wykrywanie koagulazy oraz czynnika skupiania (Clumping Factor, CF)

4.2.3.1. Wykrywanie koagulazy

W celu wykrycia wolnej koagulazy w probówkach przygotowywano osocze królicze rozcieńczone 0,9% NaCl w stosunku 1:5, a następnie dodawano masę bakteryjną badanych szczepów. Próby inkubowano w 37°C przez cztery godziny, inkubację przedłużano do 18 godzin. Po czasie czterech godzin, a następnie 18 godzin oceniano powstanie aglutynatów. Kontrolę dodatnią stanowił szczep *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

4.2.3.2. Wykrywanie czynnika skupiania (Clumping Factor, CF)

Na szkiełka podstawowe nanoszono dwie krople 0,9% NaCl. Następnie w każdej z kropli zawieszano badany szczep bakterii. Do jednej z zawiesin dodawano kroplę nierozcieńczonego osocza króliczego i oceniano powstanie aglutynatów. Kontrolę dodatnią stanowił szczep *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

4.2.4. Metody zastosowane w badaniach molekularnych

4.2.4.1. Hodowla szczepów

Szczepy badane odsiewano po odmrożeniu na podłoża krwawe. Następnie przesiewano je na podłoża płynne BHI i inkubowano w temperaturze 37°C przez 18 godzin przy użyciu inkubatora z wytrząsaniem ES-20/80 (Biosan).

4.2.4.2. Izolacja DNA

Izolację bakteryjnego DNA przeprowadzano zgodnie z protokołem izolacji dla zestawu Genomic Micro AX Staphylococcus Gravity (A&A Biotechnology). Po procesie izolacji stężenie DNA sprawdzano przy użyciu spektrofotometru Genova Nano (Jenway). Wyizolowane DNA przechowywano w szczelnie zamkniętych probówkach Eppendorf i przechowywano w temperaturze +4°C.

4.2.4.3. Łańcuchowa reakcja polimerazy

Reakcje łańcuchowej polimerazy (PCR) prowadzono w celu poszukiwania wybranych czynników kolonizacji i chorobotwórczości, poszukiwania genów oporności na antybiotyki oraz w celu potwierdzenia obecności genów metabolizmu podstawowego i sekwencjonowania określonych fragmentów DNA na potrzeby wykonania analizy MLST. W przeprowadzonych badaniach skład mieszanin reakcyjnych odpowiadał tym opisanym w podrozdziale 4.1.8.3. Warunki prowadzonych reakcji były zmienne i zależały od temperatur topnienia zastosowanych

starterów. W poniższych tabelach zestawiono sekwencje starterów wykorzystanych w badaniach molekularnych (Tabele 6 - 10).

Tabela 6. Startery zastosowane do wykrywania genów warunkujących kolonizację.

Nazwa genu	Kodowany czynnik/cecha	Nazwa startera	Sekwencja (5'-3')	Wielkość amplikonu	Źródło
<i>spsD</i>	wiązanie fibronektyny, fibrynogenu oraz elastyny	spsD-F	TGGTGTA AAAAGCCCTTCAGGTA	528 pz	(Phumthana korn et al., 2017)
		spsD-R	TTCCCTTCCCCACTTGCATTA		
<i>spsL</i>		spsL-F	AACTCCAAAGGCCGAAGAAT	201 pz	
		spsL-R	CCAGCAACAAGAAGGAGAGG		
<i>spsO</i>		spsO-F	ACGTCACCTAGTGCTGTTGATT	696 pz	
		spsO-R	TGCAACTGGCCGTTACAATAA		
<i>spsE</i>	wiązanie fibrynogenu	spsE-F	TTTCTCGTTTCTGGGCGT	1600 pz	(Kmieciak & Szewczyk, 2018)
		spsE-R	GCGTCTTCTGGTTATCGT		
<i>spsP</i>	wiązanie immunoglobulin	spsP-F	CAAAGCTGAAGCGAAAGCAGAT	366 pz	(Phumthana korn et al., 2017)
		spsP-R	GCGATACTTACGCCACCCG		
<i>spsQ</i>		spsQ-F	CAGACAAAGGTATGGACAAAGCG	217 pz	
		spsQ-R	ATTTTCGTGGTTTGTCTTAGCTTCT		
<i>ebpS</i>	wiązanie elastyny	ebpS-F	AGACGCCACAGAAAAAGA	1040 pz	(Wang et al., 2022)
		ebpS-R	GCAGATTGACCTTGTTGA		
<i>fib</i>	wiązanie fibrynogenu	fib-F	CTACA ACTACAATTGCCGTCAACAG	404 pz	(Zuniga et al., 2015)
		fib-R	GCTCTTGTAAGACCATTTTTCTTCAC		
<i>fnbA</i>	wiązanie fibronektyny	fnbA-F	GCGGAGATCAAAGACAA	1280 pz	
		fnbA-R	CCATCTATAGCTGTGTGG		
<i>fnbB</i>		fnbB-F	GTAACAGCTAATGGTCAATTGATACT	524 pz	
		fnbB-R	CAAGTTCGATAGGAGTACTATGTTC		
<i>bbp</i>	wiązanie sialoproteiny	bbp-F	AACTACATCTAGTACTCAACAACAG	575 pz	(Cavalcante et al., 2021)
		bbp-R	ATGTGCTTGAATAACACCATCATCT		
<i>cna</i>	wiązanie kolagenu	cna-F	GTCAAGCAGTTATTAACACCAGAC	423 pz	(Zuniga et al., 2015)
		cna-R	AATCAGTAATTGCACTTTGTCCACTG		
<i>eno</i>	wiązanie laminy	eno-F	ACGTGCAGCAGCTGACT	302 pz	
		eno-R	CAACAGCATCTCAGTACCTTC		
<i>coa</i>	produkcja koagulazy	coa-F	TTTGCCATGGATGAAAAAGAAATTGCTT	1500 pz	(Sewid et al., 2018)
		coa-R	TTTGGGGATCCTGACCGTTGTAAGCTTTAT		
<i>lip</i>	produkcja lipazy	lip-F	GGAAAAGCAGCAGAAAGAA	1601 pz	(Kmieciak & Szewczyk, 2018)
		lip-R	GGGTGCTGTGATGAAATA		

Tabela 7. Startery zastosowane do wykrywania genów odpowiedzialnych za produkcję biofilmu.

Nazwa genu	Kodowany czynnik/cecha	Nazwa startera	Sekwencja (5'-3')	Wielkość amplikonu	Źródło
<i>icaC</i>	produkcja biofilmu	icaC-F	ATGGGACGGATTCCATGAAAAAGA	1100 pz	(Piechota et al., 2018)
		icaC-R	TAATAAGCATTAATGTTCAATT		
<i>icaD</i>		icaD-F	CGTTAATGCCTTCTTTCTTATTGCG	166 pz	(Meroni et al., 2019)
		icaD-R	ATTAGCGCACATTCGGTGTT		
<i>bap</i>		bap-F	CCCTATATCGAAAGGTGTAGAATTG	971 pz	(Zuniga et al., 2015)
		bap-R	GCTGTTGAAGTTAATACTGTACCTGC		

Tabela 8. Startery zastosowane do wykrywania genów toksyn eksfoliatywnych i leukotoksyn.

Nazwa genu	Kodowany czynnik/cecha	Nazwa startera	Sekwencja (5'-3')	Wielkość amplikonu	Źródło	
<i>exiA</i>	produkcja toksyn eksfoliatywnych	exiA-F	AGTAACAAACTATCACATAGCG	455 pz	(Melter et al., 2017)	
		exiA-R	TTAACAGGTTATAACGTCCCC			
<i>exiB</i>		exiB-F	AAATTATTTTACTCCAGCTT	381 pz		
		exiB-R	CATGTATACCTATTAGTTCCCC			
<i>siet</i>		siet-F	ATGGAAAATTTAGCGGCATCTGG	359 pz		(Meroni et al., 2019)
		siet-R	CCATTACTTTTCGCTTGTTGTGC			
<i>lukS</i>	produkcja leukotoksyny Panton-Valentine	lukS-F	CAGGGATCCGCAAACACTATAGAAGAAATCG	868 pz	(Maali et al., 2018)	
		lukS-R	GCTTGTGACCTATTAATTATGCCCTTTAC			
<i>lukF</i>		lukF-F	TGTCGGATCCGCTAATCAAATTACACCTG	926 pz		
		lukF-R	GTCAGTCGACCTATTATGATGGGTTTTTTTCATC			
<i>pvl</i>		pvl-F	TCATTAGGTAATAATGTCTGGACATGATCCA	433 pz		(Ziasistani et al., 2019)
		pvl-R	GCATCAASTGTATTGGATAGCAAAAAGC			

Tabela 9. Startery zastosowane do wykrywania genów enterotoksyn.

Nazwa genu	Kodowany czynnik/cecha	Nazwa startera	Sekwencja (5'-3')	Wielkość amplikonu	Źródło
<i>sea</i>	enterotoksyna A	sea-F	CCTTTGGAAACGGTTAAAACG	127 pz	(Lange et al., 2020)
		sea-R	TCTGAACCTTCCCATCAAAAAC		
<i>seb</i>	enterotoksyna B	seb-F	TCGCATCAAACGACAAAACG	477 pz	
		seb-R	GCAGGTACTCTATAAGTGCCTGC		
<i>sec</i>	enterotoksyna C	sec-F	CTCAAGAACTAGACATAAAAGCTAGG	271 pz	
		sec-R	TCAAAATCGGATTAACATTATCC		
<i>sed</i>	enterotoksyna D	sed-F	CTAGTTTGTAATATCTCCTTTAAACG	319 pz	
		sed-R	TTAATGCTATATCTTATAGGGTAAACATC		
<i>see</i>	enterotoksyna E	see-F	CAGTACCTATAGATAAAGTTAAAACAAGC	178 pz	
		see-R	TAACTTACCGTGGACCCTTC		

Tabela 10. Startery zastosowane do wykrywania genów oporności.

Nazwa genu	Kodowany czynnik/cecha	Nazwa startera	Sekwencja (5'-3')	Wielkość amplikonu	Źródło
<i>mecA</i>	metrycylinooporność	mecA-F	AAAATCGATGGTAAAGGTTGGC	532 pz	(Kang et al., 2014)
		mecA-R	AGTTCTGCAGTACCGGATTTGC		
<i>blaZ</i>	produkcja β -laktamaz	blaZ-F	TGACCACTTTTATCAGCAAC	700 pz	
		blaZ-R	GCCATTTCAACACCTTCTTTC		

4.2.4.4. Elektroforeza w żelu agarozowym

Elektroforezę przeprowadzano w sposób opisany w podrozdziale 4.1.8.5.

4.2.4.5. Analiza i typowanie sekwencji multilocus (MLST)

Różnorodność genetyczną badanych szczepów *S. pseudintermedius* określano metodą MLST przy użyciu siedmiu loci. W tym celu przeprowadzano łańcuchową reakcję polimerazy dla każdego z badanych genów a następnie przekazano produkty reakcji PCR do sekwencjonowania (Genomed S.A.). Geny poddane analizie MLST oraz startery użyte w celu ich amplifikacji przedstawiono w Tabeli 11 (Jolley et al., 2018).

Tabela 11. Startery zastosowane do wykrywania genów metabolizmu podstawowego.

Nazwa genu	Nazwa startera	Sekwencja (5'-3')	Wielkość amplikonu
<i>ack</i>	ack-F	CACCACTTCACAACCCAGCAAACCT	680 pz
	ack-R	AACCTTCTAATACACGCGCACGCA	
<i>cpn60</i>	cpn60-F	GCGACTGTACTTGCACAAGCA	552 pz
	cpn60-R	AACTGCAACCGCTGTAAATG	
<i>fdh</i>	fdh-F	TGCGATAACAGGATGTGCTT	408 pz
	fdh-R	CTTCTCATGATTCACCGGC	
<i>purA</i>	purA-F	GATTACTTCCAAGGTATGTTT	490 pz
	purA-R	TCGATAGAGTTAATAGATAAGTC	
<i>pta</i>	pta-F	GTGCGTATCGTATTACCAGAAGG	570 pz
	pta-R	GCAGAACCTTTTGTTGAGAAGC	
<i>sar</i>	sar-F	GGATTTAGTCCAGTTCAAATTT	521 pz
	sar-R	GAACCATTGCCCCATGAA	
<i>tuf</i>	tuf-F	CAATGCCACAAACTCG	500 pz
	tuf-R	GCTTCAGCGTAGTCTA	

Otrzymane sekwencje analizowano z wykorzystaniem programów komputerowych a następnie porównywano ze znanymi sekwencjami w bazie danych PubMLST (<http://pubmlst.org/>) (Jolley et al., 2018). Na podstawie zidentyfikowanych alleli siedmiu genów metabolizmu podstawowego określano typy sekwencyjne (ang.

sequence type, ST) a następnie analizowano powiązania między uzyskanymi ST a innymi ST zgłoszonymi w Europie.

4.2.5. Określanie profilu lekowrażliwości metodą dyfuzyjno-krążkową

W celu określenia lekowrażliwości badanych szczepów z rodzaju *Staphylococcus* wykonywano zgodnie z rekomendacjami EUCAST (wersja 9.0) antybiogramy metodą dyfuzyjno-krążkową (EUCAST, 2019). Szczep *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 użyty został jako kontrolny. W badaniach wykorzystywano następujące krążki antybiogramowe:

• Oksacylina	1 µg
• Benzylpenicylina	1 U
• Ciprofloksacyna	5 µg
• Norfloksacyna	10 µg
• Gentamicyna	10 µg
• Erytromycyna	15 µg
• Klindamycyna	2 µg
• Tetracyklina	30 µg
• Tigecyklina	15 µg
• Chinupristyna/Dalfopristyna	15 µg
• Linezolid	10 µg
• Rifampicyna	5 µg
• Sulfametoksazol/trimetoprim	25 µg
• Kwas fusydowy	10 µg

Dla szczepów metycylinoopornych oznaczano wrażliwość wobec wankomycyny oraz daptomycyny z użyciem E-testów – pasków z gradientem stężeń przeznaczonych do określania najmniejszego stężenia hamującego wzrost drobnoustrojów – MIC.

Szczepy badane hodowano na podłożu krwawym. Przygotowywano zawiesiny bakterii o gęstości 0,5 w skali McFarlanda w 0,9% NaCl. Zawiesiny szczepów badanych posiewano w postaci murawy na podłoża agarowe Mueller-Hinton. Następnie nakładano krążki antybiogramowe i inkubowano w temperaturze 37°C przez 20 godzin. Wyniki odczytywano i interpretowano zgodnie z rekomendacjami EUCAST wersja 9.0 (EUCAST, 2019).

5. Wyniki

Tabele i ryciny tego rozdziału pokazują cechy, które szczególnie wyraźnie ilustrują realizację celu pracy – poszukiwanie szczepów i cech wskazujących na proces przemiany patogenów zwierzęcych w sposób, który umożliwi im opanowanie nowego gospodarza, jakim jest człowiek. Szczegółowe wyniki wszystkich badań wykonanych w ramach tej pracy zgromadzone są w tabelach zawartych w Aneksie.

5.1. Rodzaj *Streptococcus*

5.1.1. Identyfikacja badanych szczepów z rodzaju *Streptococcus*

Spośród analizowanych w tej pracy szczepów znaczna część pochodziła z kolekcji lub była wstępnie zidentyfikowana fenotypowo w laboratoriach klinicznych i wymagała potwierdzenia lub pogłębienia tej identyfikacji metodami genetycznymi. Szczepy pochodzące z krowiego mleka z przypadków zapalenia wymion wymagały izolacji z tego materiału klinicznego i pełnej identyfikacji.

5.1.1.1. Identyfikacja bakterii w próbkach mleka krowiego

Przebadano 660 próbek mleka krowiego, z których wyizolowano 191 szczepów katalazoujemnych ziarenkowców gramodatnich. W wyniku oceny wzrostu bakterii na podłożach (podrozdział 3.1.4.2) wytypowano 53 hodowle, które spełniały kryteria pozwalające na zaklasyfikowanie ich do rodzaju *Streptococcus*. Jednak ich identyfikacja przy użyciu zestawów API STREP pozwoliła przyporządkować do tego rodzaju już tylko 34 szczepy. Pozostałe należały do rodzaju *Enterococcus* oraz *Lactococcus*. Identyfikacja fenotypowa „do gatunku” pozwoliła na ustalenie, że spośród 34 szczepów z rodzaju *Streptococcus* 25 należało zaliczyć do gatunku *S. uberis*, trzy do *S. agalactiae*, dwa do *S. porcinus*. Cztery szczepy zakwalifikowano do gatunku *S. dysgalactiae*.

Dalsze badania wykazały rozbieżności pomiędzy identyfikacją fenotypową a genetyczną. Metodę genetyczną uznano za rozstrzygającą. Spośród 25 szczepów zidentyfikowanych wstępnie jako *S. uberis* w przypadku 21 ta identyfikacja została potwierdzona. Dwa szczepy okazały się należeć do gatunku *S. parauberis* oraz jeden szczep do *S. dysgalactiae*. Jeden szczep nie potwierdził przynależności do rodzaju.

Dwa szczepy zidentyfikowane metodami fenotypowymi jako *S. agalactiae* zidentyfikowano genetycznie jako *S. uberis* a jeden nie wykazał przynależności rodzajowej. Dwa szczepy *S. porcinus* zidentyfikowano również jako *S. uberis*. Do dalszych badań skierowano zatem 25 szczepów *S. uberis* (SU).

Identyfikacja fenotypowa czterech szczepów *S. dysgalactiae* została potwierdzona genotypowo metodą PCR. Trzy szczepy zidentyfikowano fenotypowo jako *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* (SDSE), jeden jako *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* (SDSD).

Sekwencjonowanie fragmentów genów 16S rRNA pięciu zidentyfikowanych genetycznie szczepów *S. dysgalactiae* izolowanych od bydła zaklasyfikowało je jednak do podgatunku SDSD. Sekwencje te umieszczono w bazie GenBank. Są dostępne pod numerami: OQ866346-OQ866350.

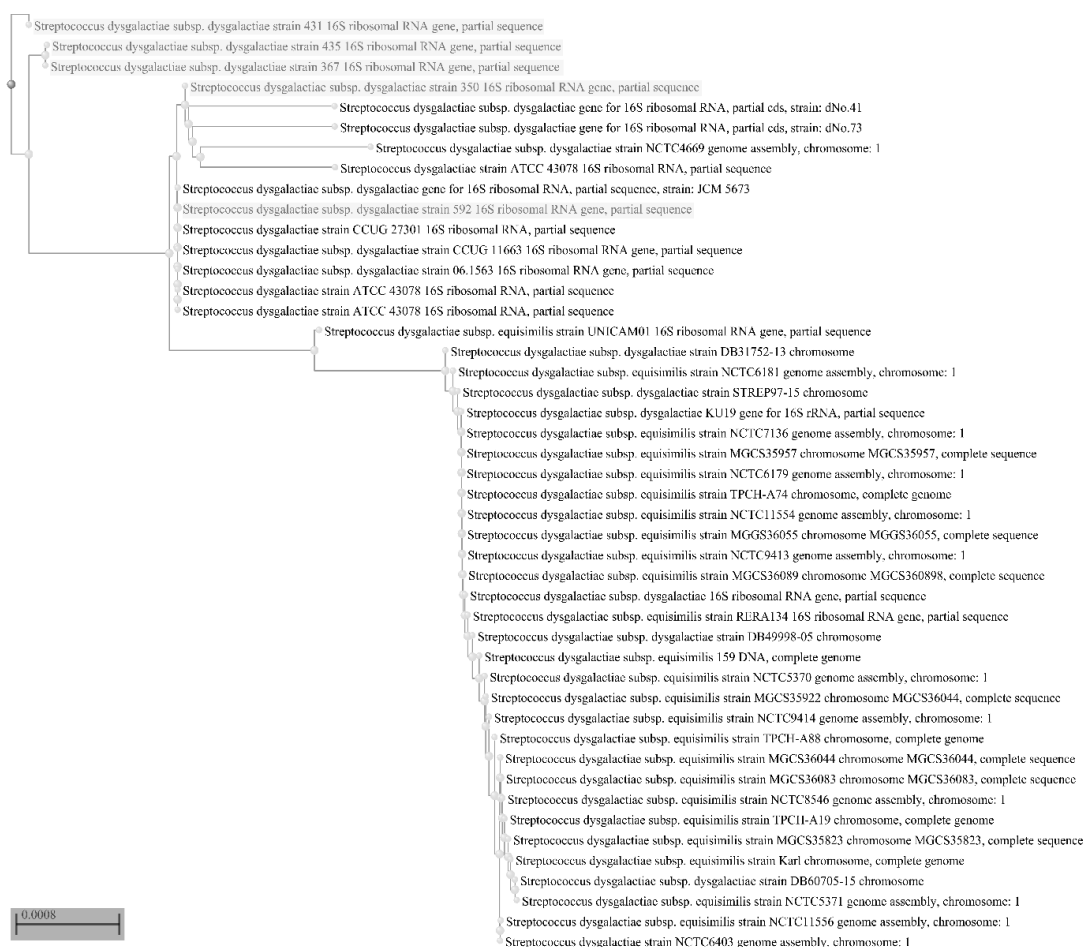
W Tabeli 12 podsumowano wyniki fenotypowej i genetycznej identyfikacji opisanych szczepów.

Tabela 12. Wyniki identyfikacji fenotypowej i genotypowej badanych szczepów izolowanych z zapalenia wymion krów.

Lp.	Nr szczepu	Identyfikacja fenotypowa	Identyfikacja genetyczna do rodzaju <i>Streptococcus</i>	Identyfikacja genetyczna do gatunku
1.	15	<i>S. uberis</i>	tak	<i>S. uberis</i>
2.	33	<i>S. uberis</i>	tak	<i>S. uberis</i>
3.	36	<i>S. uberis</i>	tak	<i>S. uberis</i>
4.	39	<i>S. uberis</i>	tak	<i>S. uberis</i>
5.	43	<i>S. uberis</i>	tak	<i>S. uberis</i>
6.	70	<i>S. uberis</i>	tak	<i>S. uberis</i>
7.	82	<i>S. agalactiae</i>	nie	-
8.	115	<i>S. uberis</i>	tak	<i>S. uberis</i>
9.	120	<i>S. uberis</i>	tak	<i>S. uberis</i>
10.	196	<i>S. uberis</i>	tak	<i>S. uberis</i>
11.	233	<i>S. uberis</i>	tak	<i>S. uberis</i>
12.	244	<i>S. uberis</i>	tak	<i>S. uberis</i>
13.	249	<i>S. uberis</i>	tak	<i>S. parauberis</i>
14.	261	<i>S. uberis</i>	tak	<i>S. parauberis</i>
15.	272	<i>S. uberis</i>	tak	<i>S. uberis</i>
16.	273	<i>S. uberis</i>	tak	<i>S. uberis</i>
17.	279	<i>S. uberis</i>	tak	<i>S. uberis</i>
18.	310	<i>S. uberis</i>	tak	<i>S. uberis</i>
19.	340	<i>S. uberis</i>	tak	<i>S. uberis</i>
20.	345	<i>S. uberis</i>	nie	-
21.	348	<i>S. uberis</i>	tak	<i>S. uberis</i>
22.	350	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>dysgalactiae</i>	tak	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>dysgalactiae</i>
23.	351	<i>S. uberis</i>	tak	<i>S. uberis</i>
24.	367	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	tak	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>dysgalactiae</i>
25.	375	<i>S. agalactiae</i>	tak	<i>S. uberis</i>

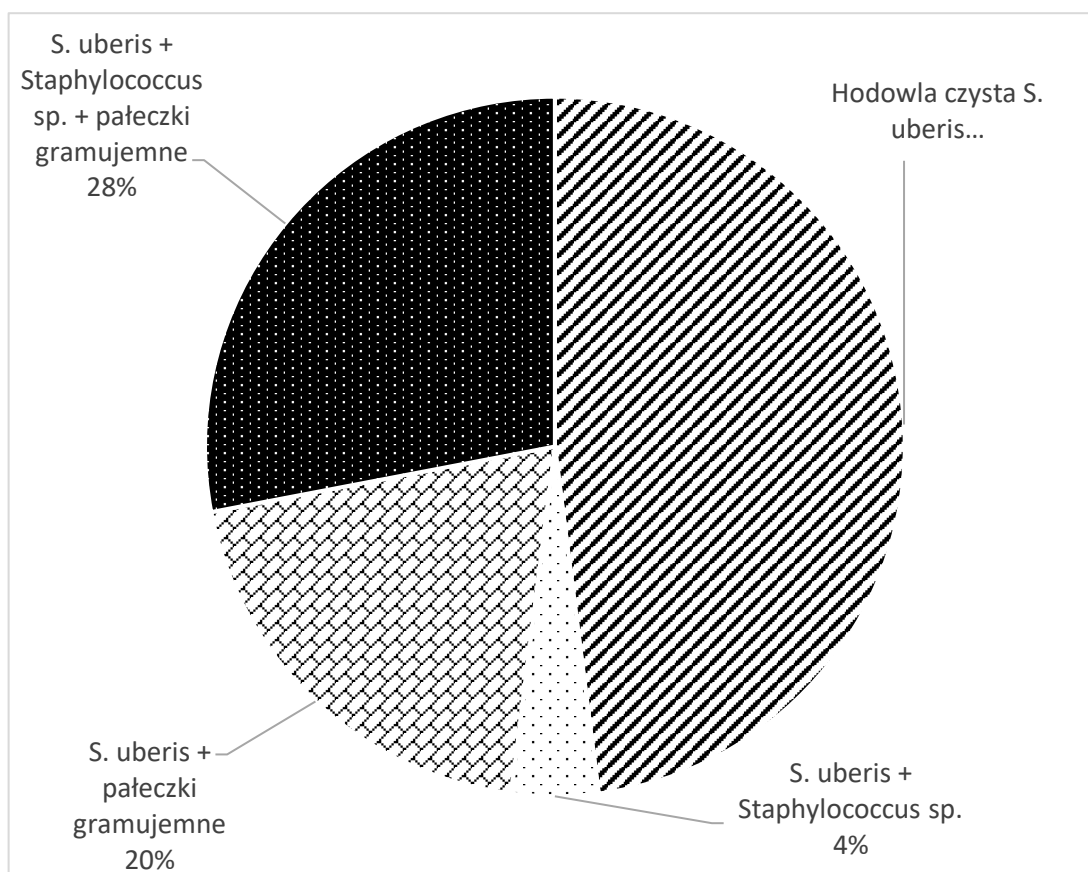
26.	389	<i>S. agalactiae</i>	tak	<i>S. uberis</i>
27.	395	<i>S. uberis</i>	tak	<i>S. uberis</i>
28.	401	<i>S. uberis</i>	tak	<i>S. uberis</i>
29.	408	<i>S. porcinus</i>	tak	<i>S. uberis</i>
30.	418	<i>S. uberis</i>	tak	<i>S. uberis</i>
31.	431	<i>S. uberis</i>	tak	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>dysgalactiae</i>
32.	435	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	tak	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>dysgalactiae</i>
33.	584	<i>S. porcinus</i>	tak	<i>S. uberis</i>
34.	592	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	tak	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>dysgalactiae</i>

Rycina 2 przedstawia powiązania filogenetyczne między zsekwencjonowanymi fragmentami genów 16S rRNA szczepów SDDSD pochodzących od bydła. Szczepy badane w ramach tej pracy zostały zaznaczone szarym kolorem.



Rycina 2. Powiązania filogenetyczne pomiędzy badanymi szczepami SDDSD.

W czasie izolacji szczepów, w badanym materiale klinicznym – mleku krów z zapaleniem wymion, w połowie posiewów obecności *S. uberis* towarzyszyły inne rodzaje bakterii. Na Rycinie 3 przedstawiono udział próbek zawierających czyste hodowle szczepów *S. uberis* (48%) i tych, które stanowiły hodowle mieszane (52%). Oprócz *S. uberis* w hodowlach mieszanych występowały gronkowce oraz pałeczki gramujemne.



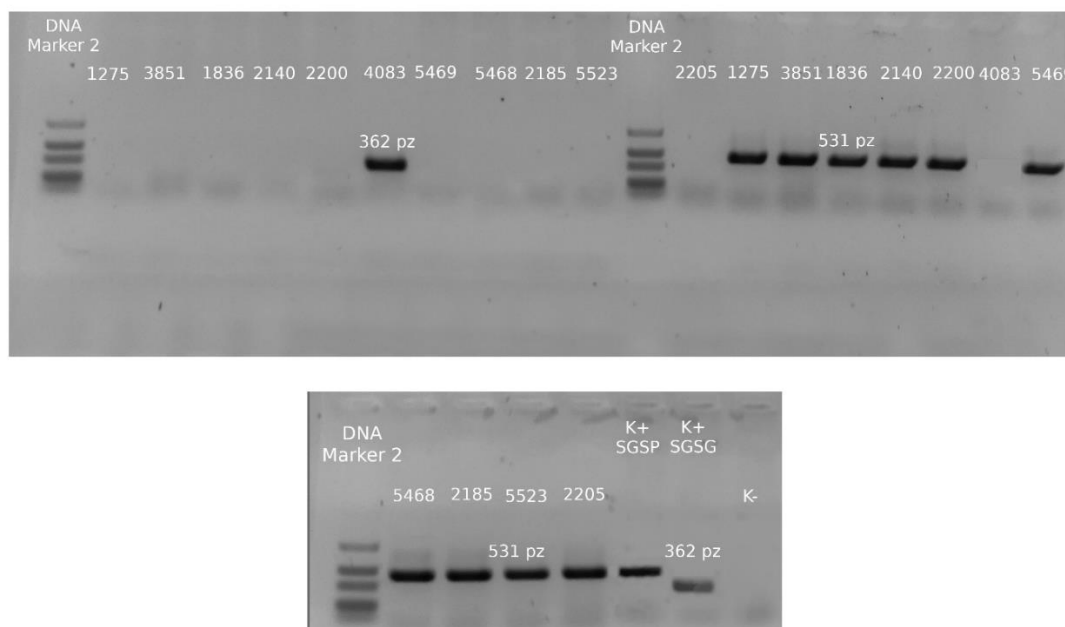
Rycina 3. Materiał do badań zawierający paciorkowce *Streptococcus uberis*.

Szczepy *S. uberis* o numerach SU 15, SU 36, SU 39, SU 43, SU 196, SU 233, SU 244, SU 272, SU 273, SU 310, SU 418 oraz SU 584 tworzyły czyste hodowle bezpośrednio po posiewie z materiału klinicznego, co oznacza, że były jedynym czynnikiem etiologicznym infekcji, która rozwinęła się u zwierzęcia. Czysta hodowla z materiału klinicznego była także w przypadku dwóch szczepów zidentyfikowanych jako SDSD (SDSD 350, SDSD 367). W trzech posiewach, z których wyizolowano SDSD obecne były także pałeczki gramujemne oraz gronkowce.

5.1.1.2. Identyfikacja *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* oraz *S. gallolyticus*

Szczepy *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* pochodzące z materiałów klinicznych od ludzi identyfikowano genetycznie do podgatunku. W przypadku wszystkich szczepów metoda genetyczna potwierdziła wynik otrzymany metodą MALDI TOF MS.

Reakcje PCR ze specyficznymi dla podgatunków *S. gallolyticus* starterami pozwoliły na zidentyfikowanie 10 szczepów do *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus* (SGSP) oraz jednego do podgatunku *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* (SGSG). Obraz rozdziału produktów reakcji PCR przedstawiono na Rycinie 4.



Rycina 4. Rozdział produktów PCR w identyfikacji szczepów *S. gallolyticus*.

Obecność produktu reakcji odpowiadającemu sekwencji o wielkości 362 pz świadczy o przynależności szczepu do podgatunku *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* (SGSG), natomiast prążek o wielkości 531 pz do podgatunku *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus* (SGSP).

Wyniki identyfikacji wszystkich szczepów będących przedmiotem badań tej pracy przedstawiono w Aneksie w Tabelach A1.

5.1.2. Zdolności kolonizacyjne szczepów badanych gatunków paciorkowców

5.1.2.1. Zaspokajanie wymagań pokarmowych i niszczenie tkanek

Zdolność rozkładu związków wynikająca z właściwości metabolicznych szczepów pokazuje ich potencjał mnożenia w różnych środowiskach.

Właściwości glikolityczne zbadano wobec czterech cukrów: laktozy, fruktozy, glukozy oraz sorbitolu. Do tych badań wytypowano 20 szczepów należących do gatunków *S. uberis* (SU), *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* (SDSD), *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* (SDSE) oraz *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus* (SGSP).

Właściwości glikolityczne wobec sorbitolu zaobserwowano tylko u szczepów izolowanych od zwierząt: SU oraz SDSD. Szczepy wyizolowane od ludzi takiej cechy nie miały. Szczepy SDSE wykazały też mniejsze spektrum substratowe w przypadku

rozkładu cukrów niż szczepy izolowane od zwierząt. Rzadziej rozkładały laktozę i fruktozę w porównaniu z pozostałymi: SU, SDSD oraz SGSP. Znaczenie tych cech może przyczynić się do oceny siły związku poszczególnych badanych szczepów z gospodarzem. Wyniki ze wskazaniem numerów szczepów pokazano w Tabeli 13.

Tabela 13. Właściwości glikolityczne wybranych szczepów.

Materiał kliniczny	Nr szczepu	Właściwości glikolityczne			
		Rozkład laktozy	Rozkład fruktozy	Rozkład glukozy	Rozkład sorbitolu
od zwierząt	SU 15	+	+	+	+
	SU 36	+	+	+	+
	SU 39	+	+	+	+
	SU 43	+	+	+	+
	SU 196	+	+	+	+
	SDSD 350	+	+	-	-
	SDSD 367	+	+	+	+
	SDSD 431	+	+	+	-
od ludzi	SDSE 159	-	-	+	-
	SDSE 176	-	-	+	-
	SDSE 202	-	+	+	-
	SDSE 252	+	+	+	-
	SDSE 387	-	+	+	-
	SDSE 540	-	-	+	-
	SDSE 634	+	+	+	-
	SDSE 3674	+	+	+	-
	SDSE 26529	+	-	+	-
	SGSP 1275	+	+	+	-
	SGSP 3851	+	+	+	-
	SGSP 5468	+	+	+	-

Zdolność do rozkładu białek oceniano, oznaczając aktywność proteaz w stosunku do kazeiny i żelatyny. Rozkład kazeiny występował powszechnie wśród szczepów od gospodarzy zwierzęcych. Obecność kazeinazy zaobserwowano u wszystkich szczepów SU i SDSD, ale także u licznych *S. gallolyticus* (9/11). Enzym ten występował rzadziej w grupie SDSE (10/36). Żelatynaza była aktywna tylko u 10 z 36 szczepów izolowanych od zwierząt, jednak była obecna w 22 z 36 szczepów SDSE pochodzących z infekcji ludzkich.

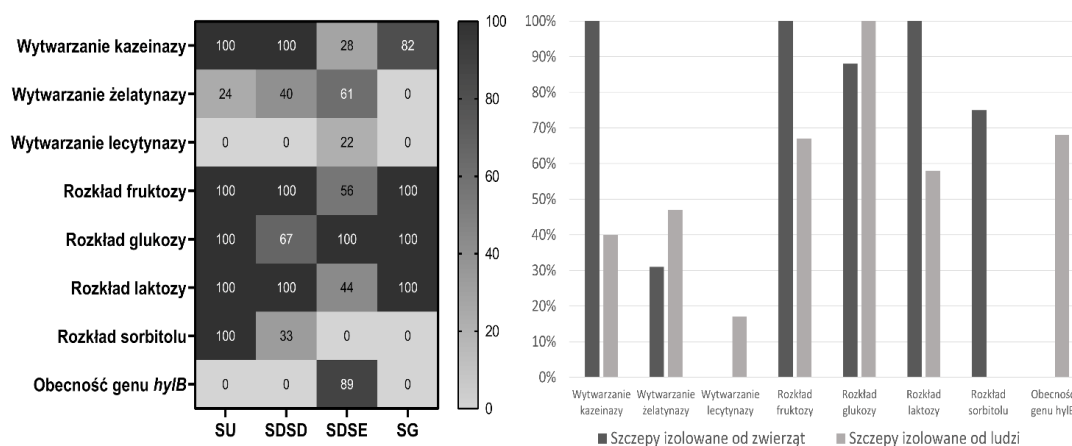
Właściwości lipolityczne oceniano w oparciu o obecność lipazy oraz lecytynazy. Zdolność do rozkładu tłuszczów nie była powszechną cechą wśród badanych szczepów. Jedynie SDSE izolowane od ludzi wytwarzały lecytynazę (8/36).

Cecha cytolizy niszczącej krwinki owcze była powszechna wśród badanych szczepów. Zdolność do wywoływania hemolizy zaobserwowano u 66% szczepów. Hemolizyny szczepów izolowanych od ludzi doprowadzały do częściowego zniszczenia krwinek czerwonych w wyniku redukcji hemoglobiny do methemoglobiny, co demonstrowało się jako hemoliza α . Hemoliza tego rodzaju wystąpiła u 36% *S. uberis* (9/25), wszystkich *S. parauberis* (2/2) oraz *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* (5/5).

Szczepy izolowane od ludzi dysponowały cytolizynami o innej specyficzności. *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* (36/36) powodowały hemolizę typu β , co związane jest z całkowitym rozpadem krwinek czerwonych i usunięciem hemoglobiny. Jednak szczepy drugiego gatunku – *S. gallolyticus* (obu podgatunków SGSP i SGSG), wszystkie izolowane z materiałów klinicznych od ludzi, nie hemolizowały krwinek w podłożu z krwią owczą.

Niszczenie tkanek to także rozkład macierzy międzykomórkowej. Poszukiwano genu *hylB* kodującego liazę hialuronianową, warunkującą rozkład kwasu hialuronowego. Gen *hylB* był obecny u większości szczepów SDSE, izolowanych od ludzi (32/36). Nie miały go jednak szczepy gatunków wyizolowanych od zwierząt – *S. uberis*, *S. parauberis* (SP) oraz SDSD.

Na Rycinie 5 zestawiono wyniki badań zdolności kolonizacyjnych badanych szczepów paciorkowców obejmujące właściwości proteolityczne, lipolityczne, glikolityczne a także obecność genu *hylB*. Cechami różnicującymi badane szczepy w zależności od ich pochodzenia były głównie obecność kazeiny, zdolność do rozkładu laktozy i sorbitolu jako cechy charakterystyczne dla szczepów izolowanych z materiałów od zwierząt oraz obecność żelatynazy, lecytynazy i występowanie genu *hylB* jako cechy charakteryzujące szczepy z materiałów klinicznych od ludzi. Przedstawione wyniki wskazują również, że badane *S. gallolyticus* cechami takimi jak obecność kazeiny oraz rozkład cukrów dzielą swoje zdolności ze szczepami pochodzenia zwierzęcego.



Rycina 5. Cechy związane z niszczeniem tkanek i zaspokajaniem potrzeb pokarmowych odróżniające szczepy pochodzące od zwierząt od izolowanych od ludzi.

Wyniki uzyskane w oznaczeniach cech wskazanych w tym podrozdziale dla wszystkich szczepów będących przedmiotem badań tej pracy przedstawiono w Aneksie w Tabelach A3.

5.1.2.2. Geny kodujące białka biorące udział w kolonizacji organizmu gospodarza

Poszukiwano genów odpowiedzialnych za wiązanie białek macierzy zewnątrzkomórkowej gospodarza (ang. *extracellular matrix*, ECM) - fibronektyny, lamininy i kolagenu (Metody, rozdz. 4.1.4.3, Tabela 2). Wiązanie tych białek doprowadza do zmian w obrębie tkanek, ułatwiając bakteriom kolonizację.

Geny kodujące białka wiążące fibronektynę, lamininę i kolagen miały tylko niektóre szczepy. Wśród szczepów od zwierząt (SU i SDSD) nieliczne miały geny *prtF1* oraz *fbp* odpowiedzialne za wiązanie fibronektyny. Geny te występowały liczniej u izolowanych od ludzi - SDSE. W grupie szczepów *S. uberis* u większości (15/25) obecny był gen *prtF2*, którego nie miały jednak szczepy izolowane od ludzi. Gen *lmb* odpowiedzialny za wiązanie lamininy miały prawie wszystkie SDSE (34/36) a w grupie szczepów izolowanych od bydła wystąpił tylko u 34% z nich. Tylko jeden szczep, SDSE 387, miał gen *cbp* kodujący wiązanie kolagenu. Tabela 14 przedstawia częstość występowania genów białek wiążących ECM oraz szczepy, które nimi dysponowały.

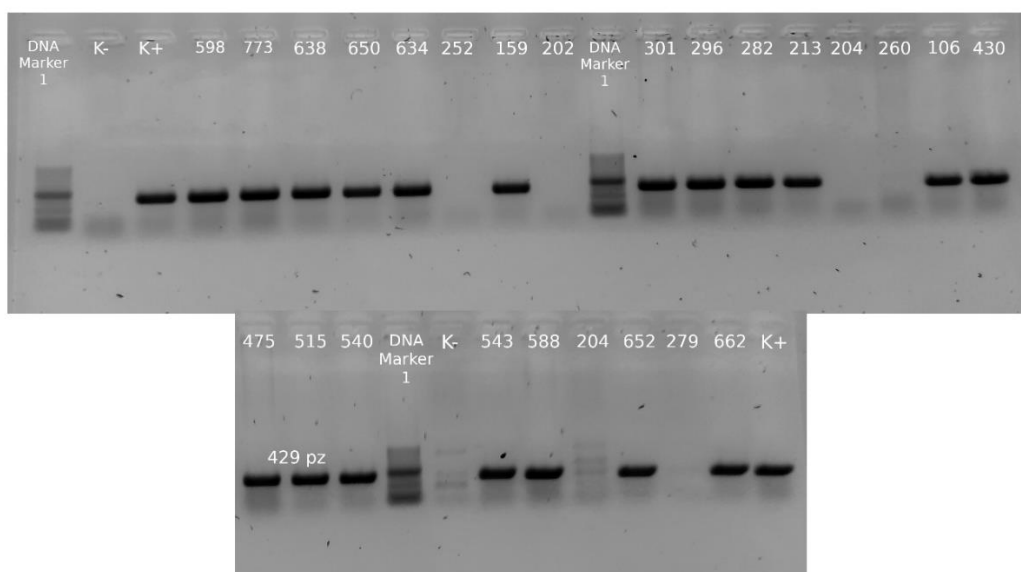
Tabela 14. Występowanie genów kodujących białka wiążące macierz zewnątrzkomórkową gospodarza.

Geny kodujące białka macierzy zewnątrzkomórkowej gospodarza	GATUNEK			
	<i>S. uberis</i> (n=25)	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>dysgalactiae</i> (n=5)	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i> (n=36)	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i> (n=10)
Wiązanie fibronektyny				
<i>fbp</i>	0	1 (SDSD 367)	4 (SDSE 598, 5073, 8402, 26529)	0
<i>prtF1</i>	2 (SU 348, 351)	2 (SDSD 350, 431)	18 (SDSE 106, 159, 202, 213, 252, 301, 376, 387, 464, 469, 515, 540, 588, 598, 634, 638, 650, 773)	0
<i>prtF2</i>	15 (SU 15, 33, 39, 43, 70, 115, 120, 233, 244, 272, 273, 279, 310, 340, 351)	0	0	0
Wiązanie lamininy				
<i>lmb</i>	6 (SU 348, 351, 395, 401, 408, 418)	5 (SDSD 350, 367, 431, 435, 592)	34 (SDSE 106, 159, 176, 202, 213, 252, 279, 282, 296, 301, 376, 387, 430, 464, 468, 469, 475, 515, 540, 543, 588, 598, 634, 638, 650, 652, 662, 668, 773,	2 (SGSP 3851, 5468)

			2866, 3674, 5073, 8402, 26529)	
Wiązanie kolagenu				
<i>cbp</i>	0	0	1 (SDSE 387)	0

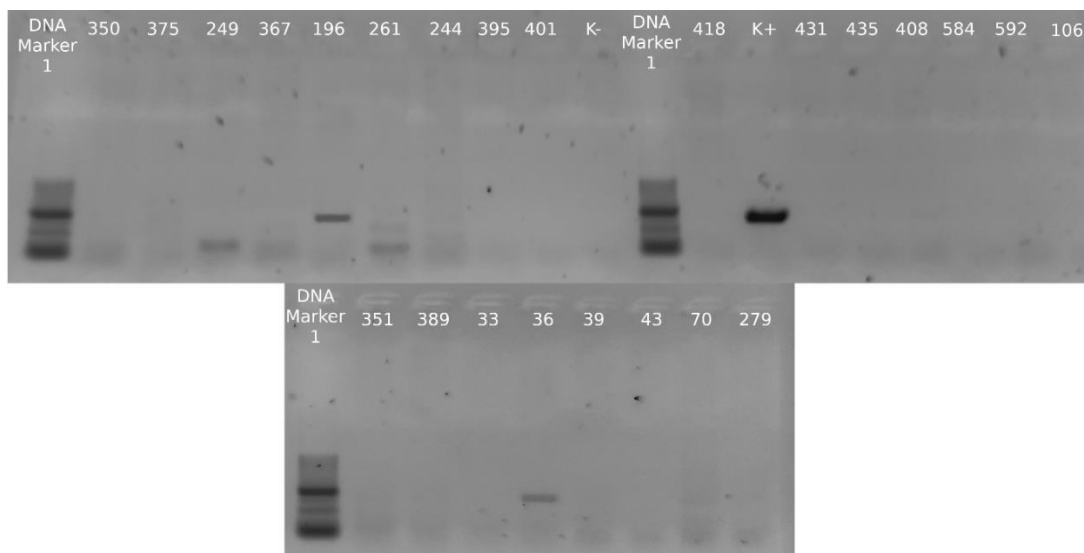
Ekspresja genu kodującego dehydrogenazę aldehydu 3-fosfoglicerynowego (ang. *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*, GAPDH) *gapC* ma wpływ na wiązanie przez bakterie fibronektyny, lizozymu i białek cytoszkieletu (Speziale et al., 2019). Obecność tego genu (Metody, rozdz. 4.1.4.3, Tabela 2) wykazano u większości szczepów *S. uberis* (24/25), wszystkich SDSD (5/5) i SDSE (36/36), ale tylko u dwóch (2/11) szczepów SGSP.

Dla kolonizacji organizmu gospodarza przez paciorkowce znaczenie ma także białko immunogenne Isp. Gen kodujący to białko – *isp1* występował licznie u szczepów izolowanych od ludzi, zarówno SDSE (31/36) jak i *S. gallolyticus* (9/11). Jego obecność wykryto u 11 szczepów izolowanych od bydła (SDSD 367, SU 261). Na Rycinie 6 przedstawiono wynik poszukiwania genu *isp1* dla wskazanych szczepów.



Rycina 6. Wyniki elektroforezy produktów PCR dla genu *isp1*.

W patogenezie zakażeń paciorkowcowych istotne znaczenie ma także fosfolipaza A2 destabilizująca błony i ułatwiająca kolonizację. U wszystkich badanych szczepów poszukiwano zatem kodującego ją genu *sla* (Metody, rozdz. 4.1.4.3, Tabela 2). Jego obecność wykazano tylko u dwóch szczepów *S. uberis* (SU 36, SU 196). Nie było go u szczepów innych gatunków. Szczep SU 36 wykazał ponadto określoną metodą Real-time PCR ekspresję tego genu. Na Rycinie 7 przedstawiono rozdział elektroforetyczny produktów reakcji PCR dla genu *sla*. Produkt reakcji widać tylko w przypadku szczepów SU 36 oraz SU 196.



Rycina 7. Wyniki elektroforezy produktów PCR dla genu *sla*.

5.1.2.3. Zdolność badanych szczepów do tworzenia biofilmu

Przyjęty model badania nie pozwolił na pełną ocenę zdolności tworzenia biofilmu przez badane szczepy. Tylko pojedyncze szczepy w tym modelu doświadczalnym wykazywały słabą zdolność wytwarzania biofilmu na powierzchni polistyrenu. Aktywne w tym zakresie szczepy znalazły się wśród gatunków *S. uberis* (SU 115, SU 196, SU 233, SU 310, SU 340, SU 351, SU 418) i *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus* (SGSP 1275, SGSP 3851, SGSP 1836, SGSP 2140).

Szczepy *S. uberis*, które w tych badaniach tworzyły biofilm były wyposażone w geny odpowiedzialne za adhezję do tkanek, w tym te odpowiedzialne za wiązanie fibronektyny oraz charakterystyczne tylko dla tego gatunku, nie poszukiwane u innych badanych szczepów *mtuA* i *sua*. Szczepy SGSP, które tworzyły biofilm miały gen *ispI*. Zdolność do tworzenia biofilmu nie wykazała jednak związku z potencjalnymi zdolnościami adhezyjnymi, czyli obecnością genu *ispI* czy genów kodujących białka wiążące ECM. W Tabeli 15 przedstawiono szczepy produkujące biofilm oraz ich inne cechy sprzyjające kolonizacji.

Tabela 15. Cechy sprzyjające kolonizacji u szczepów produkujących biofilm.

Gatunek	Nr szczepu	Tworzenie biofilmu	Geny kodujące białka wiążące ECM	Gen <i>isp1</i>
<i>S. uberis</i>	SU 115	+	<i>gapC, prtF2, mtuA</i>	-
	SU 196	+	<i>gapC, mtuA, sua</i>	-
	SU 233	+	<i>gapC, prtF2, mtuA, sua</i>	+
	SU 310	+	<i>gapC, prtF2, mtuA, sua</i>	-
	SU 340	+	<i>gapC, prtF2, mtuA, sua</i>	-
	SU 351	+	<i>gapC, prtF1, prtF2, gapC, lmb, mtuA, sua</i>	+
	SU 418	+	<i>gapC, lmb, mtuA, sua</i>	-
<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i>	SU 1275	+	-	+
	SU 1836	+	-	+
	SU 2140	+	-	+
	SU 3851	+	<i>lmb</i>	+

Wyniki uzyskane w poszukiwaniu genów odpowiedzialnych za kolonizację tkanek i zdolność do tworzenia biofilmów wszystkich szczepów będących przedmiotem badań tej pracy przedstawiono w Aneksie w Tabelach A4 oraz A5.

5.1.3. Inwazja i toksyczność

5.1.3.1. Wyrastanie w surowicy

Zdolność wyrastania w obecności surowicy pozwala ocenić możliwości przystosowania się szczepów do życia w organizmie określonego gospodarza, zwierzęcego i ludzkiego.

Wśród szczepów izolowanych od bydła 53% (17/32) było stymulowane obecnością surowicy ludzkiej. Wzrost 11 szczepów *S. uberis* był stymulowany przez surowicę ludzką, a siedmiu tylko przez surowicę bydlęcą. Pięć z nich było stymulowanych przez obie surowice. Wzrost tylko jednego szczepu (SU 33) był stymulowany przez surowicę bydlęcą a hamowany przez surowicę ludzką.

W przypadku szczepów SDSD cztery z pięciu badanych reagowały stymulacją wzrostu zarówno na dodatek surowicy bydlęcej jak i ludzkiej. W Tabeli 16 pokazano liczbę szczepów, których wzrost stymulowany był przez określony rodzaj surowicy. W nawiasach podano numery tych szczepów.

Tabela 16. Stymulacja wzrostu szczepów SU i SDSD w obecności surowicy ludzkiej.

Gatunek	Liczba szczepów stymulowanych obecnością ludzkiej surowicy	
	Tylko surowica ludzka	Surowica ludzka i surowica bydlęca
<i>S. uberis</i> (n=25)	6 (SU 115, 120, 233, 310, 348, 351)	5 (SU 244, 273, 279, 340, 375)
<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>dysgalactiae</i> (n=5)	-	4 (SDSD 350, 367, 431, 592)

W przypadku szczepów SDSE izolowanych z infekcji u ludzi wzrost 22/36 stymulowany był obecnością surowicy ludzkiej (61%). Spośród nich 12 stymulowanych było dodatkowo przez surowicę bydlęcą. Na wzrost dwóch szczepów (SDSE 301, SDSE 515) dodatnio wpływał tylko dodatek surowicy bydlęcej (Tabela 17). Wzrost tylko jednego szczepu stymulowanego surowicą ludzką (SDSE 3674) hamowała surowica bydlęca.

Tabela 17. Stymulacja wzrostu szczepów SDSE w obecności surowicy ludzkiej i bydlęcej.

Gatunek	Liczba szczepów stymulowanych obecnością ludzkiej surowicy		
	Tylko surowica ludzka	Tylko surowica bydlęca	Surowica ludzka i surowica bydlęca
<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	10 (SDSE 159, 176, 202, 252, 282, 430, 468, 634, 652, 3674)	2 (SDSE 301, 515)	12 (SDSE 204, 260, 279, 376, 387, 464, 469, 475, 588, 2866, 5073, 8402)

Izolowane od ludzi *S. gallolyticus* w porównaniu z pozostałymi gatunkami nie odnosiły korzyści z obecności w podłożu surowicy. Wzrost tylko jednego szczepu (SGSP 2185) był stymulowany przez surowicę bydlęcą. Wzrost sześciu szczepów był hamowany surowicą bydlęcą, a trzech spośród nich także ludzką.

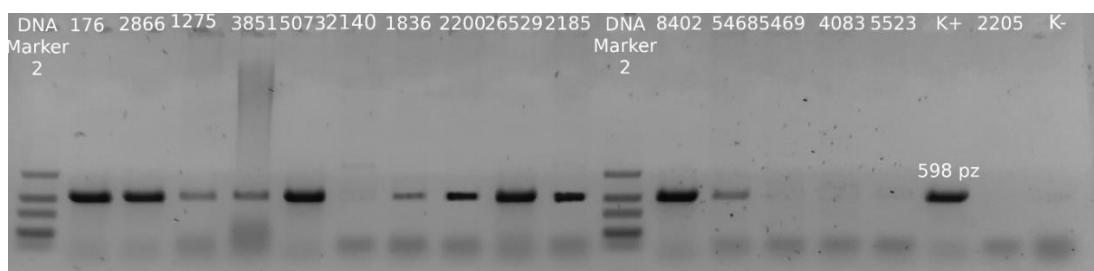
Wyniki uzyskane w badaniach wpływu surowicy na wzrost wszystkich szczepów będących przedmiotem badań tej pracy przedstawiono w Aneksie w Tabelach A6.

5.1.3.2. Poszukiwanie genu streptokinazy oraz ocena jej aktywności wobec plazminogenu ludzkiego i bydlęcego

Badania rozpoczęto od poszukiwania w genomach wszystkich szczepów genu *ska* - kodującego streptokinazę – paciorkowcowy aktywator plazminogenu. Wykorzystana sekwencja pochodziła z *S. pyogenes* (Metody, rozdz. 4.1.4.3, Tabela 3).

Wśród szczepów izolowanych z materiałów klinicznych od ludzi gen ten miały wszystkie badane szczepy SDSE. U szczepów *S. gallolyticus* wykryto go u 6/10 SGSP. Gen *ska* miały także również wszystkie badane SDSD izolowane z materiałów od zwierząt oraz 10 z 25 szczepów *S. uberis*.

Rycina 8 przedstawia rozdział elektroforetyczny produktów PCR genu *ska* dla szczepów *S. gallolyticus* i kilku SDSE.



Rycina 8. Wyniki elektroforezy produktów PCR dla genu *ska*.

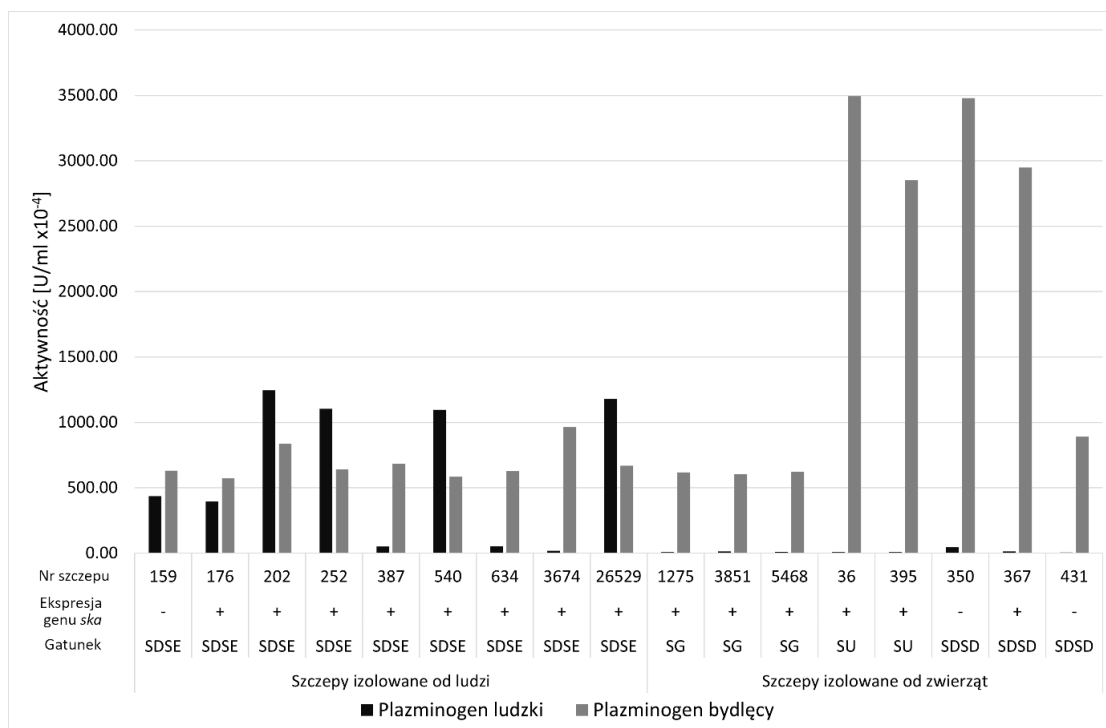
Dla wybranych szczepów badano ekspresję genu *ska* metodą Real-time PCR oraz oznaczano fenotypowo aktywność streptokinazy dla plazminogenu ludzkiego i bydlęcego. Subiektywny wybór szczepów do tych badań był podyktowany nagromadzeniem w ich genomach czynników chorobotwórczości i będzie dyskutowany w dalszej części pracy. Spośród badanych trzech szczepów SDSD ekspresję genu *ska* wykazał tylko SDSD 367, oba badane *S. uberis* (SU 36 i SU 395) i wszystkie badane SGSG (3/3) oraz osiem z dziewięciu badanych SDSE. Wśród szczepów tego podgatunku ekspresji nie wykazano tylko u SDSE 159.

Wykonane metodą jakościową badanie aktywności w stosunku do plazminogenu ludzkiego wykazało brak tej aktywności u szczepów izolowanych od zwierząt, zarówno *S. uberis* jak i SDSD. Metoda ilościowa pokazała jednak niewielką aktywność wszystkich badanych szczepów: najniższą w przypadku SU 36, SU 395 i SDSD 431. Porównywalnie słabszą aktywność w stosunku do tego substratu (plazminogenu ludzkiego) wykazały także izolowane od ludzi szczepy SDSE 3674, SDSE 634, SDSE 387 i wszystkie badane SGSP. Najwyższą aktywność miały względem tego substratu szczepy SDSE 202, SDSE 252, SDSE 540 i SDSE 26529.

Aktywność wszystkich badanych szczepów, zarówno w badaniu jakościowym jak i ilościowym wykazano w stosunku do plazminogenu bydlęcego. Wyrażona w jednostkach na mililitr aktywność była w przypadku szczepów SDSD i SU izolowanych od zwierząt wielokrotnie wyższa niż aktywność tych samych szczepów w stosunku do plazminogenu ludzkiego, co szczególnie wyraźnie widać w przypadku szczepów *S. uberis*. Taka zależność wystąpiła też u *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus*.

Wyniki tych badań przedstawiono na Rycinie 9. W kontekście oceny przystosowania do innego gospodarza zwracają w tym badaniu uwagę szczepy izolowane od ludzi, które obok słabszej zdolności aktywacji plazminogenu ludzkiego zachowały znaczny potencjał wykorzystania plazminogenu bydlęcego, czyli SDSE

387, SDSE 634 i SDSE 3674. Izolowany od bydła szczep SDSD 350 ma natomiast najlepsze możliwości wykorzystania w procesie patogenezy plazminogenu ludzkiego spośród badanych szczepów tego podgatunku. Co ciekawe, fenotypowo aktywne względem plazminogenu okazały się szczepy SDSE 159, SDSD 350 i SDSD 431, które nie wykazały ekspresji genu *ska*.



Rycina 9. Aktywność streptokinazy wobec plazminogenu ludzkiego i bydłowego u wybranych szczepów.

Wyniki uzyskane w badaniach aktywności streptokinazy wybranych szczepów będących przedmiotem badań tej pracy przedstawiono w Aneksie w Tabelach A7.

5.1.3.3. Hamowanie aktywności układu immunologicznego gospodarza

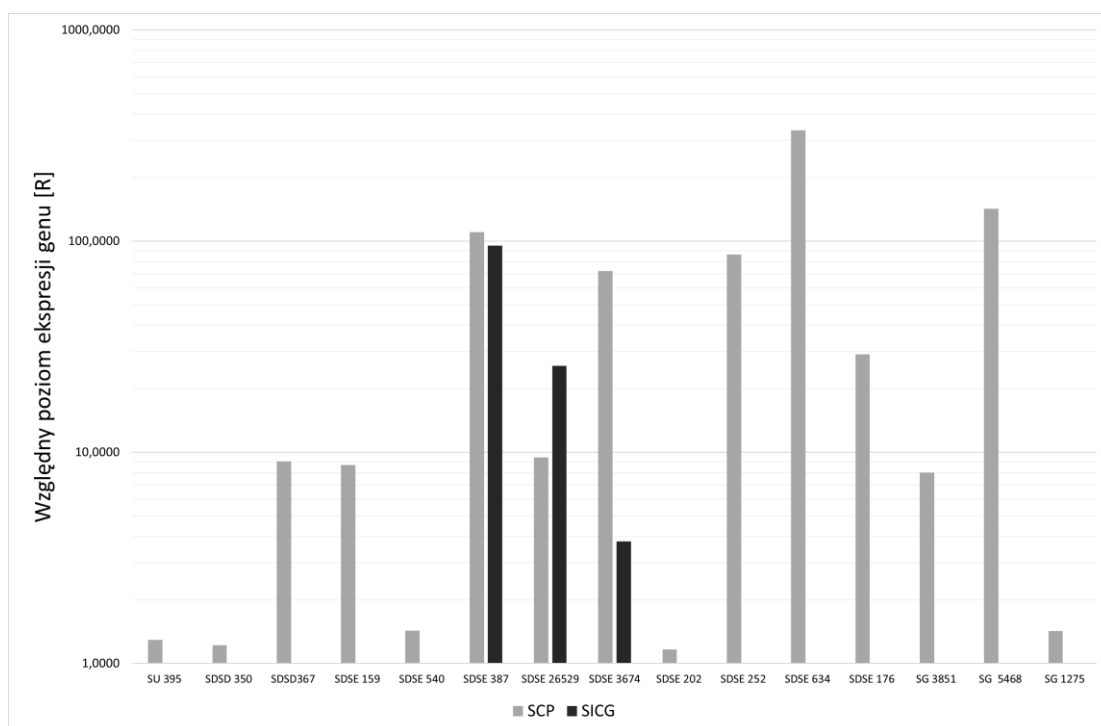
Badano możliwości hamowania aktywności układu immunologicznego gospodarza przez oddziaływanie na jego układ dopełniacza. W genomach badanych szczepów poszukiwano odpowiednich genów. Sekwencje starterów do tych badań, pochodziły z *S. pyogenes* (Metody, rozdz. 4.1.4.3, Tabela 3).

Hamowanie aktywności dopełniacza warunkuje wytwarzana przez paciorkowce peptydaza czynnika C5a dopełniacza Scp o zdolności rozszczepiania zarówno składowych C5a ale też C3. Gen *scp* kodujący peptydazę miało 91% (43/47) szczepów izolowanych od ludzi (SDSE i SGSP). Wśród szczepów izolowanych od zwierząt (SU i SDSD) gen *scp* miały jeden (1/25) szczep *S. uberis* (SU 395) oraz trzy (3/5) SDSD (SDSD 350, SDSD 367, SDSD 435). Ekspresja genu *scp* wystąpiła u wszystkich posiadających ten gen wybranych do tego badania izolatów czterech

gatunków. Szczególnie silną wykazano u szczepów SDSE 252, SDSE 387, SDSE 634, SDSE 3674, SDSE 5468.

Gen *sicG* kodujący paciorkowcowy inhibitor dopełniacza SIC, miały tylko trzy szczepy, SDSE 387, SDSE 3674, SDSE 26529. U wszystkich tych szczepów wykazano zdolność ekspresji tego genu, przy czym szczep SDSE 387 charakteryzował się najwyższym jej poziomem. Sekwencja starterów pochodziła od *S. dysgalactiae* (Metody, rozdz. 4.1.4.3, Tabela 3).

Na Rycinie 10 przedstawiono poziomy ekspresji genów *scp* i *sicG*, których produkty wpływają na aktywność dopełniacza u wybranych szczepów.

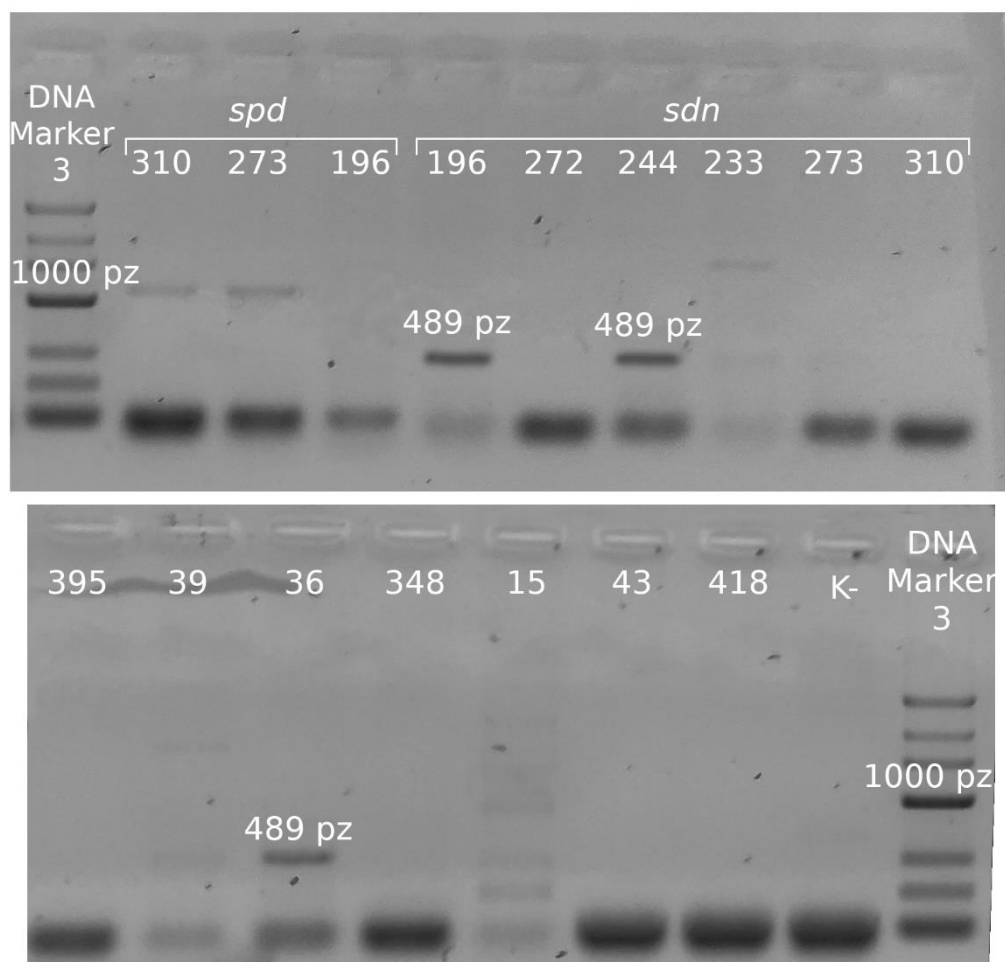


Rycina 10. Poziomy ekspresji genów *scp* i *sicG* u wybranych szczepów.

Szczepy izolowane od zwierząt na ogół charakteryzowały się niskim poziomem ekspresji genu *scp* w porównaniu do grupy szczepów od ludzi. Jednak szczep SDSA 367 izolowany od zwierzęcia wykazał ekspresję tego genu na wysokim poziomie. Dwa SDSE (SDSE 202 i SDSE 540) oraz SGSP 1275 miały niski poziom ekspresji w porównaniu z pozostałymi szczepami izolowanymi od ludzi.

Dla przeżycia bakterii i unikania odpowiedzi immunologicznej gospodarza znaczenie ma także działanie DNaz paciorkowcowych. Zmniejszają one aktywność bójczą neutrofilów a także, poprzez zdolność do zniszczenia bakteryjnego DNA, ograniczają możliwość rozpoznania komórek drobnoustrojów przez układ immunologiczny gospodarza. W genomach wybranych 27 szczepów bakterii SU, SDSA i SDSE poszukiwano genu kodującego streptodornazę (*sdn*) oraz paciorkowcową DNazę I (*spdI*). Obie sekwencje pochodziły od *S. pyogenes* (Metody, rozdz. 4.1.4.3, Tabela 3).

Genu *spd1* nie miał żaden z badanych, a gen *sdn* miały tylko trzy szczepy *S. uberis* (3/13) oraz dwa szczepy SDSD (2/5). Żaden z badanych dziewięciu SDSE nie był wyposażony w poszukiwane geny. Na Rycinie 11 przedstawiono rozdział elektroforetyczny produktów reakcji PCR dla genu *sdn* wykrytych u szczepów *S. uberis*.



Rycina 11. Wyniki elektroforezy produktów PCR dla genu *sdn*.

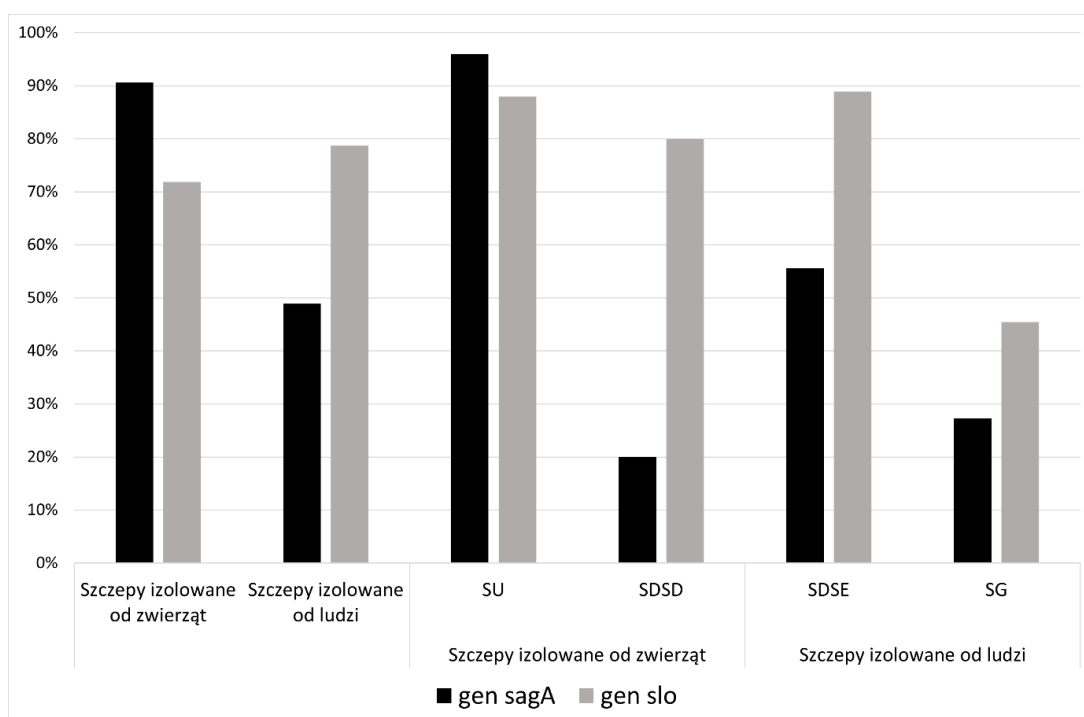
5.1.3.4. Geny toksynotwórczości

Poszukiwano genów kodujących streptolizyny. Gen *sagA* koduje prekursor streptolizyny S warunkujący jej syntezę, gen *slo* - streptolizynę O. Streptolizyny te uszkodzają błony różnych typów komórek gospodarza, zwiększając cytotoksyczność komórek bakteryjnych. Geny streptolizyn wykrywane na podstawie sekwencji starterów tych genów u *S. pyogenes* były powszechne w badanych szczepach paciorkowców, zarówno w grupie izolatów od bydła jak i od ludzi. Miały je wszystkie SU (100%), 2/5 SDSD (40%), 33/36 SDSE (92%) oraz 5/11 *S. gallolyticus* (SG), (45%).

Gen kodujący prekursor streptolizyny S miały 24/25 *S. uberis*, 2/2 *S. parauberis* oraz 1/5 SDSD (SDSD 367). W grupie szczepów izolowanych od

ludzi *sagA* miało 20/36 szczepów SDSE oraz 3/11 *S. gallolyticus*. Gen ten znaleziono zatem tylko u 49% szczepów pochodzących z przypadków klinicznych od ludzi a u 84% szczepów izolowanych od zwierząt.

Poszukiwanie genu kodującego streptolizynę O także pokazało szeroką jego obecność wśród szczepów wszystkich badanych gatunków obu grup. U szczepów izolowanych od bydła gen *slo* miały 22/25 *S. uberis* oraz jeden (1/5) SDSD. Nie miały go natomiast szczepy *S. parauberis*. Wśród szczepów izolowanych od ludzi miały go 32/36 szczepy SDSE oraz 5/10 SGSP. Gen ten występował zatem w tej grupie szczepów częściej niż kodujący prekursor streptolizyny S - znaleziono go u 79% szczepów pochodzących z przypadków klinicznych od ludzi oraz u 72% szczepów od zwierząt. Obecność genów streptolizyn wśród badanych gatunków przedstawiono na Rycinie 12. Zwraca uwagę bardzo powszechne występowanie tych genów u szczepów *S. uberis* oraz najmniej liczne wśród *S. gallolyticus*.



Rycina 12. Występowanie genów streptolizyn wśród badanych szczepów.

Produkt kolejnego poszukiwanego w tych badaniach genu - *dppA*, ma wpływ na ekspresję kolejnej z toksyn paciorkowcowych - pirogennej egzotoksyny B. Gen ten jest składową operonu *dpp*. Znaleziono go u nielicznych szczepów od bydła (SU 351, SU 395, SDSD 367). Powszechnie występował wśród szczepów wyizolowanych z materiału klinicznego od ludzi, u 32/36 szczepów SDSE i dwóch należących do różnych podgatunków szczepów *S. gallolyticus* (SGSG 4083, SGSP 5523).

5.1.4. Ocena ekspresji genów u wybranych szczepów

Metodą Real-time PCR określono poziomy ekspresji genów *ska*, *scp*, *sicG* oraz *sla* wykrytych u wybranych szczepów obdarzonych znaczną liczbą cech

chorobotwórczości. Wyniki wartości R – względnego poziomu ekspresji przedstawiono w Tabeli 18.

Tabela 18. Względne poziomy ekspresji badanych genów dla wybranych szczepów paciorkowców.

Nr szczepu	Względny poziom ekspresji genu badanego [R]			
	<i>ska</i>	<i>scp</i>	<i>sicG</i>	<i>sla</i>
SU 36	0,2496	-	-	1,521
SU 395	0,1265	0,1295	-	-
SDSD 350	0	0,1219	-	-
SDSD 367	1,3353	0,9068	-	-
SDSD 431	0	-	-	-
SDSE 159	0	0,8669	-	-
SDSE 176	8,7369	2,9157	-	-
SDSE 202	0,7382	0,1165	-	-
SDSE 252	4,9833	8,6569	-	-
SDSE 387	0,5275	11,0338	9,5164	-
SDSE 540	0,1265	0,1430	-	-
SDSE 634	11,9349	33,4481	-	-
SDSE 3674	22,9769	7,2293	0,3790	-
SDSE 26529	0,1871	0,9453	2,5676	-
SGSP 1275	0,5252	0,1425	-	-
SGSP 3851	0,1997	0,8007	-	-
SGSP 5468	12,4307	14,2636	-	-

„-„ – brak poszukiwanego genu

W przypadku szczepów, dla których $R_{ska} > 4$ wysoka była również wartość R_{scp} – powyżej 2,5. Jeden ze szczepów izolowanych od ludzi, SDSD 387 wykazał wysokie wartości R_{scp} oraz R_{sicG} przy stosunkowo niskim poziomie ekspresji genu *ska*. Zwraca uwagę wysoka ekspresja genu streptokinazy (*ska*) i peptydazy C5 dopełniacza (*scp*) u szczepów SDSE 634 i SGSP 5468. Oba te szczepy wyizolowane zostały z materiałów od ludzi, pierwszy SDSE z rany, a drugi SGSP z moczu. Szczep SDSE 3674 o najwyższej spośród badanych ekspresji genu streptokinazy (*ska*) pochodził z wymazu z pochwy. Trudno jednak wiązać poziomy ekspresji poszczególnych genów z pochodzeniem szczepów z określonych materiałów czy też od ludzi, czy od zwierząt.

5.1.5. Poszukiwanie szczepów przelamujących barierę międzygatunkową

Przedstawiony w rozdziałach opisujących wyniki przegląd cech badanych gatunków pozwolił na wyłonienie szczepów o szczególnych cechach. Szukano takich cech, dla których rozkład wyników wskazywał na większą częstość dodatnich lub

ujemnych wartości dla określonego gatunku lub grup: szczepów z materiałów klinicznych od ludzi czy tych izolowanych od zwierząt. Widoczne reguły, choć nie są istotne statystycznie ze względu na zbyt małą liczbę szczepów, wyłaniają spośród grup tu zbadanych te pojedyncze szczepy, których profile chorobotwórczości, w zakresie tu badanym, wskazują na potencjalną zdolność nieodległego przełamania bariery między gospodarzem ludzkim i zwierzęcym.

W poniższych tabelach zebrano cechy tych szczepów, które w wyraźny sposób odróżniały się od typowych dla swojego gatunku lub grupy. W Tabeli 19 wskazano szczepy izolowane z materiałów od zwierząt, które mają wiele cech wskazujących na dobre przystosowanie do organizmu człowieka. Tabela 20 wskazuje natomiast szczepy izolowane z materiałów klinicznych od ludzi posiadające wiele cech szczepów pochodzących od zwierząt.

Tabela 19. Szczepy izolowane od zwierząt o cechach upodabniających je do szczepów izolowanych od ludzi.

Gatunek/ numer szczepu	Źródło szczepu	Zdolność rozkładu					Kolonizacja			Gen <i>isp1</i>	Wyrastanie w surowicy		Streptokinaza			Inwazja		Toksyczność		
		ŻEL	KAZ	LAKT	FRU	SOR	<i>fbp</i>	<i>prtF1</i>	<i>lmb</i>		L	B	<i>ska</i> ekspresja	Aktywacja		<i>scp</i>	<i>sicG</i>	<i>sagA</i>	<i>slo</i>	<i>dppA</i>
														PL	PB					
SDSD 367*	mleko krowie	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+/+	-	+	+	-	+	-	+	-	+
SDSD 350	mleko krowie	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+/-	+	+	+	-	-	-	-
SDSD 431	mleko krowie	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+/-	-	+	-	-	-	+	-
SU 348	mleko krowie	+	+				-	+	+	-	+	+	-			-	-	+	-	-
SU 351	mleko krowie	+	+				-	+	+	+	+	+	+			-	-	+	+	+
SU 395	mleko krowie	-	+				-	-	+	+	+	+	+/+	-	+	+	-	+	+	+
SU 261	mleko krowie	+	+				-	-	-	+	+	+	-			-	-	+	-	-
SU 36	mleko krowie	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+/+	-	+	-	-	+	+	-
SDSD 592*	mleko krowie	-	+				-	-	+	-	+	+	+			-	-	-	-	-

ŻEL – żelatyna, KAZ – kazeina, LAC – laktoza, FRU – fruktoza, SOR – sorbitol, L- ludzka, B – bydłęca, PL – plazminogen ludzki, PB – plazminogen bydłęcy; brak wyniku oznacza brak określonego badania

X – cecha uznana za charakterystyczną dla szczepów izolowanych od zwierząt; X – cecha uznana za charakterystyczną dla szczepów izolowanych od ludzi

* - szczepy zidentyfikowane fenotypowo jako SDSE

Tabela 20. Szczepy izolowane od ludzi o zachowanych cechach szczepów gatunków izolowanych od zwierząt.

Gatunek /numer szczepu	Źródło szczepu	Zdolność rozkładu		Kolonizacja			Gen <i>isp1</i>	Wyrastanie w surowicy		Streptokinaza	Inwazja		Toksyczność		
		ŻEL	KAZ	<i>fbp</i>	<i>prtF1</i>	<i>lmb</i>		L	B	<i>ska</i>	<i>scp</i>	<i>sicG</i>	<i>sagA</i>	<i>slo</i>	<i>dppA</i>
SGSP 2205	odbyt	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
SGSP 4083	krew	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+
SGSP 2185	mocz	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	
SDSE 430	gardło	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
SDSE 204	ucho	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	
SDSE 260	ucho	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	
SDSE 387	odleżyna	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
SDSE 296	rana	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
SDSE 543	rana	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
SDSE 202	ropień	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+
SDSE 540	rana	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
SDSE 3674	pochwa	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-

ŻEL – żelatyna, KAZ – kazeina, L- ludzka, B – bydłęca, PL – plazminogen ludzki, PB – plazminogen bydłęcy; brak wyniku oznacza brak określonego badania

X – cecha uznana za charakterystyczną dla szczepów izolowanych od zwierząt; X – cecha uznana za charakterystyczną dla szczepów izolowanych od ludzi

5.1.6. Lekooporność badanych szczepów paciorkowców

W badaniach tej pracy oceniono także szanse leczenia zakażeń spowodowanych przez badane gatunki bakterii, jeśli wystąpiłyby u ludzi. Lekooporność wszystkich szczepów oceniono metodą fenotypową (krążkowo-dyfuzyjną) oraz metodą genetyczną, poszukując odpowiedzialnych za oporność genów. Zakres przedstawionych tu badań objął wszystkie chemioterapeutyki rekomendowane w takich zakażeniach (Metody, rozdz. 4.1.4.3, rozdz. 4.1.5). Wyniki przedstawione w tej części rozprawy zostały opublikowane we własnej pracy „Phenotypic and genotypic characterization of antimicrobial resistance in streptococci isolated from human and animal clinical specimens” (Głajzner et al., 2023b).

Wszystkie badane szczepy, zarówno pochodzące z materiałów klinicznych od bydła jak i od ludzi wykazały fenotypową i genotypową wrażliwość wobec antybiotyków β -laktamowych, które stanowią terapię pierwszego rzutu w zakażeniach paciorkowcowych. Nie wystąpiła zmniejszona strefa zahamowania wzrostu w przypadku krążków z benzylpenicyliną i ampicyliną czy cefalosporynami. U żadnego ze szczepów nie wykryto genu *pbp2b*, kodującego oporność receptorową na antybiotyki β -laktamowe.

Najwięcej było szczepów opornych na tetracykliny. W grupie szczepów izolowanych od bydła było to 34%. Oporne na ten antybiotyk były wszystkie badane szczepy SDSD (5/5), 4/25 SU (SU 43, SU 70, SU 233 oraz SU 418) oraz dwa *S. parauberis* (SP 249 i 261). Oporność w grupie szczepów od ludzi była jeszcze wyższa i dotyczyła 68% - wśród SDSE było to 22/36 szczepów opornych, a *S. gallolyticus* 10/11. Geny kodujące oporność na tę grupę antybiotyków miały wszystkie badane szczepy. U wszystkich szczepów SU i SDSD obecny był gen *tetM*. U dziewięciu szczepów *S. uberis* wykryto także gen *tetK*, u jednego *tetO*, u dwóch *tetL* oraz *tetS*. W przypadku SDSD u jednego obecny był też *tetK* a u dwóch *tetO*. Wśród izolatów SDSE od ludzi 30/36 szczepów miało gen *tetO* a tylko jeden szczep nie miał genów kodujących oporność na tetracykliny (SDSE 2866). Podobnie, jak u szczepów izolowanych od bydła, najpowszechniej występował gen *tetM* (u 86% szczepów). Pozostałe badane geny występowały sporadycznie. Osiem szczepów miało gen *tetK*, trzy szczepy *tetS* i jeden szczep *tetL*. Szczepy SDSE 252, SDSE 260, SDSE 376, SDSE 387, SDSE 634 i SDSE 638 miały po trzy geny klasy *tet*. Wszystkie szczepy *S. gallolyticus* miały w swoich genomach gen *tetM*. Ponadto powszechniej występowały w tej grupie także inne geny klasy *tet*: 6/11 miało *tetK*, 5/11 *tetL* a trzy szczepy *tetO*. SGSP 1275 miał cztery z badanych genów *tet*.

U 19% badanych paciorkowców zaobserwowano również oporność na makrolidy, linkozamidy i streptograminy typu MLS_B. Odnotowano ją u trzech szczepów wyizolowanych z materiałów od zwierząt (SU 279, SU 348 oraz SDSD 431). Dwa z nich prezentowały mechanizm konstytutywny oporności (ang. *constitutive resistance to macrolide-lincosamide-streptogramin B antibiotics*,

cMLS_B), co oznacza brak możliwości skutecznego zastosowania w leczeniu erytromycyny oraz klindamycyny. U jednego szczepu (SU 348) wystąpił M-fenotyp, co pozwala, mimo oporności na makrolidy, zastosować w leczeniu linkozamidy.

U szczepów izolowanych od ludzi również wykryto różne mechanizmy oporności MLS_B. Mechanizm cMLS_B znaleziono u 5/36 szczepów SDSE. U SDSE 652 wystąpił M-fenotyp, natomiast u trzech szczepów (SDSE 159, SDSE 301, SDSE 8402) indukcyjny mechanizm oporności na makrolidy, linkozamidy i streptograminy (ang. *inductive resistance to macrolide-lincosamide-streptogramin B antibiotics*, iMLS_B). Wśród szczepów *S. gallolyticus* trzy charakteryzowały się typem oporności cMLS_B (SGSP 2140, SGSP 2185, SGSP 2200). Poza szczepami, u których wykazano mechanizm MLS_B, u szczepu *S. uberis* (SU 233), *S. parauberis* (SP 261) i SDSE (SDSE 464) wykryto fenotypową oporność jedynie na linkozamidy.

Także geny oporności na makrolidy, linkozamidy i streptograminy licznie występowały u badanych szczepów. Znaleziono je u 48% badanych. U izolowanych od bydła, kodujące metylazę geny *ermB* i *ermC* znaleziono u kolejno 5/32 i 7/32 szczepów tej grupy. Gen *ermB* wystąpił u trzech szczepów SU (SU 39, SU 272, SU 389). Powszechniej występował jednak gen *ermC* – u sześciu *S. uberis* oraz jednego *S. parauberis*. Szczep SU 389 miał oba wyżej wymienione geny. Wśród SDSD wystąpiły tylko dwa, u których obecny był gen *ermB* (SDSD 431, SDSD 435). U izolatów gatunków *S. uberis*, *S. parauberis* oraz *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* nie stwierdzono obecności *ermA* i *ermTR*. Natomiast często obecny był gen *lnuD*, kodujący oporność na linkozamidy (72% szczepów). Geny klasy *erm* częściej występowały wśród gatunków wyizolowanych z materiałów klinicznych od ludzi - SDSE i SG. W tej grupie geny klasy *erm* często występowały parami – taką zależność zaobserwowano u 14 z 27 (12 szczepów SDSE i 2 SGSP). Wśród tych szczepów obecne były zarówno *ermB*, *ermC* jak i *ermA* oraz *ermTR*. Połączenie genów *ermA+ermTR* zaobserwowano u sześciu z nich (SDSE 279, SDSE 296, SDSE 301, SDSE 464, SDSE 652, SDSE 8402), *ermB+ermC* u dwóch (SDSE 204, SDSE 260). Dwa z nich miały zarówno *ermA*, *ermTR* jak i *ermC* (SDSE 464 oraz SDSE 8402). Połączenie *ermB+ermTR* wystąpiło tylko u *S. gallolyticus* (SGSP 1275, SGSP 3851). Szczepy pochodzące z materiałów od ludzi w porównaniu z izolowanymi od bydła dużo rzadziej wyposażone były w gen *lnuD* kodujący nukleotydylotransferazę. Wystąpił on licznie u *S. gallolyticus* (8/11) natomiast u SDSE jedynie u pięciu szczepów (5/36 – SDSE 176, SDSE 638, SDSE 5073, SDSE 8402, SDSE 26529). Geny klasy *erm* częściej występowały u szczepów z materiałów klinicznych od ludzi, natomiast *lnu* u szczepów od zwierząt. U badanych szczepów nie wykryto genu *mefA* jak również *lnuA*, które kodują kolejno oporność na grupę makrolidów oraz linkozamidów.

Na Rycinie 13 zestawiono występowanie genów oporności u szczepów charakteryzujących się różnymi typami MLS_B.

Typ oporności MLS _B	Typ oporności MLS _B														
	431	279	348	159	301	8402	652	204	260	296	279	634	2140	2200	2185
Geny	Geny														
	SDSD	SU	SU	SDSE	SDSE	SDSE	SDSE	SDSE	SDSE	SDSE	SDSE	SDSE	SG	SG	SG
cMLS _B	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
iMLS _B	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M-fenotyp	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>ermA</i>	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0
<i>ermB</i>	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1
<i>ermC</i>	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0
<i>ermTR</i>	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0
<i>lnuD</i>	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0

Rycina 13. Geny oporności klasy *erm* i *lnu* u szczepów z opornością typu MLS_B.

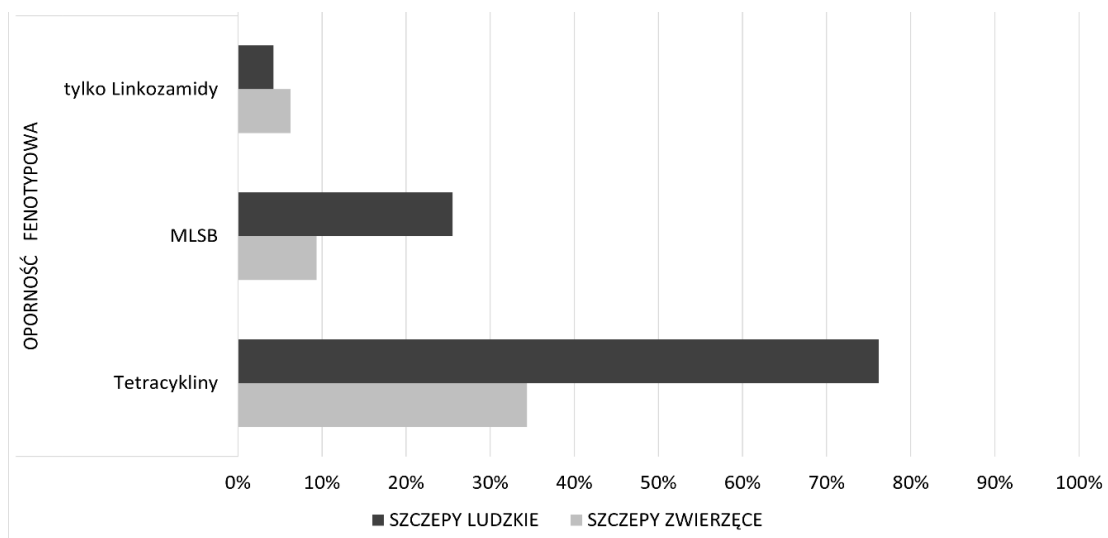
U badanych szczepów najczęściej występował konstytutywny typ oporności MLS_B. U tych izolowanych od zwierząt ten mechanizm oporności łączył się z obecnością genów *ermB* i *ermC*. W przypadku *S. gallolyticus* był to gen *ermB*. Tylko u szczepów SDSE wystąpił mechanizm oporności typu iMLS_B. U szczepów SDSE z opornością MLS_B najczęściej obecne były *ermA*+*ermTR*.

Wszystkie szczepy badane były wrażliwe na fluorochinolony, które mogłyby być zastosowane w leczeniu zakażeń. Mimo to w obu grupach stwierdzono obecność genów kodujących oporność na tę grupę antybiotyków, *parC* i *gyrA*. Nie było ich jednak u szczepów od zwierząt SDSD i szczepów z materiałów od ludzi SG. Dodatkowo, genu *gyrA* nie wykryto wśród *S. uberis* i *S. parauberis*. Gen *parC* obecny był u 16/25 SU. Trzynaście SDSE miało gen *parC* kodujący mutacje topoizomerazy IV, natomiast tylko u trzech wystąpił *gyrA* (SDSE SDSE 159, SDSE 260, SDSE 8402) kodujący mutacje w obrębie gyrazy.

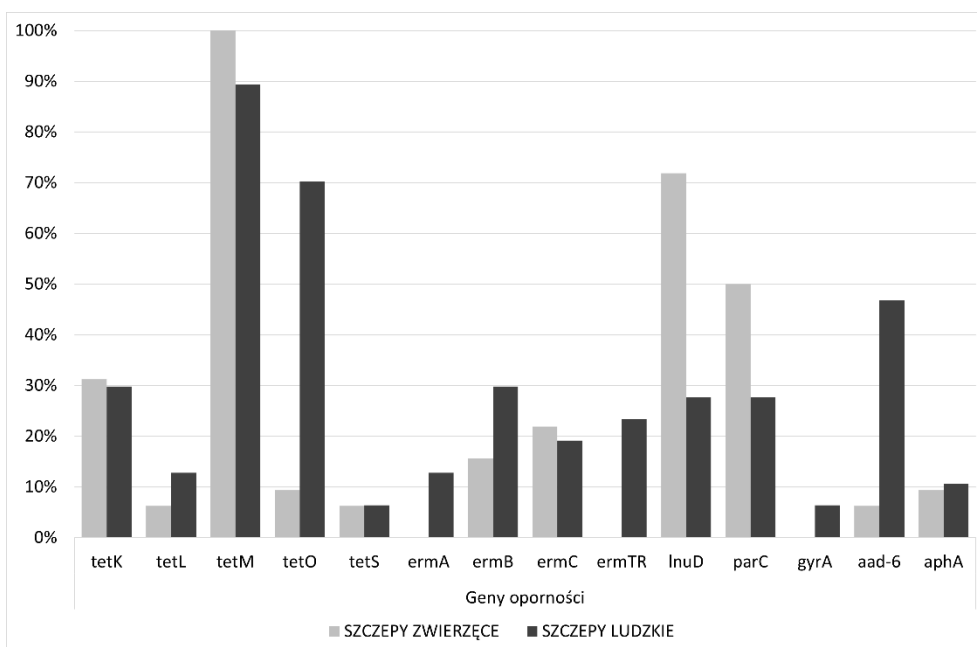
W leczeniu zakażeń paciorkowcowych w praktyce klinicznej stosowane jest połączenie antybiotyków β-laktamowych z aminoglikozydami (np. gentamicyną czy amikacyną). W tych badaniach poszukiwano genów *aad-6* oraz *aphA* kodujących enzymy odpowiedzialne za inaktywację aminoglikozydów. Gen *aphA* miał tylko jeden szczep SU 395, gen *aad-6* nie był obecny w genomach tego gatunku. Szczep SDSD 431 wyposażony był w oba geny, natomiast SDSD 435 miał *aphA*, a SDSD 592 *aad-6*. Wśród izolowanych od ludzi SDSE i SG *aad-6* oraz *aphA* były powszechne – znaleziono je u połowy szczepów.

Wśród badanych dwa szczepy były odporne na rifampicynę. Jeden z nich, SU 348 charakteryzował się ponadto M-fenotypem oporności MLS_B. Drugi, SDSE 8402, odporny był dodatkowo na erytromycynę (iMLS_B) oraz tetracyklinę i dysponował szerokim wachlarzem genów oporności (*tetK*, *tetM*, *ermA*, *ermC*, *ermTR*, *lnuD*, *gyrA* oraz *aad-6*).

Wszystkie szczepy paciorkowców były wrażliwe na wankomycynę, linezolid i sulfametoksazol z trimetoprimem. Oporność fenotypową oraz geny oporności paciorkowców zestawiono na Rycinach 14 i 15.



Rycina 14. Odsetek szczepów o oporności na tetracyklinę, makrolidy, linkozamidy i streptograminę B wykazanej fenotypowo.



Rycina 15. Geny oporności badanych szczepów.

Jak pokazano na Rycinie 14 szczepy izolowane od ludzi częściej były odporne na tetracykliny oraz prezentowały fenotyp MLS_B. Częściej też występował w tej grupie gen oporności *tetO* w porównaniu ze szczepami od zwierząt. Jednak pojedyncze szczepy gatunków wyizolowanych od bydła: SU 351 oraz SDSD 435 i SDSD 592 również miały go w swoim genomie. Geny kodujące oporność typu MLS_B, *ermA* i *ermTR*, znaleziono tylko w grupie szczepów pochodzących od ludzi. W przypadku genu *aad-6* kodującego oporność na aminoglikozydy wystąpił on u blisko 50% szczepów z materiałów od ludzi, a jedynie u dwóch SDSD, 431 i 592. Szczepy izolowane od bydła charakteryzowały się natomiast częstszym występowaniem genów *lnuD* oraz *parC*.

W Tabeli 21 przedstawiono geny oporności, których częstość występowania w grupach szczepów izolowanych od ludzi i od zwierząt była znacząco różna.

Tabela 21. Obecność genów oporności występujących rzadziej w grupach szczepów izolowanych od zwierząt lub od ludzi.

Gen oporności	Obecność u szczepów izolowanych od bydła	Obecność u szczepów izolowanych od ludzi
<i>lnuD</i>	częsta 23/32	rzadka 5/36 (SDSE 176, 638, 5073, 8402, 26529) 7/11 (SGSP 1836, 2185, 2200, 2205, 3851, 5468, 5469 oraz SGSG 4083)
<i>tetO</i>	rzadka 1/25 (SU 351) 2/5 (SDSD 435, 592)	częsta 35/47
<i>aad-6</i>	rzadka 2/5 (SDSD 435, 592)	częsta 22/47

Wyniki uzyskane w badaniach lekowrażliwości wszystkich szczepów będących przedmiotem badań tej pracy przedstawiono w Aneksie w Tabelach A10 oraz A11.

5.2. Rodzaj *Staphylococcus*

Wyniki przedstawione w tym rozdziale zostały opublikowane w pracy „Pathogenic potential and antimicrobial resistance of *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from human and animals” (Głajzner et al., 2023a).

W tej części pracy porównywano dwie grupy po siedem szczepów *Staphylococcus pseudintermedius* izolowane od ludzi i od zwierząt towarzyszących, oceniając ich potencjał chorobotwórczy i lekowrażliwość.

5.2.1. Zdolności kolonizacyjne szczepów badanych *S. pseudintermedius*

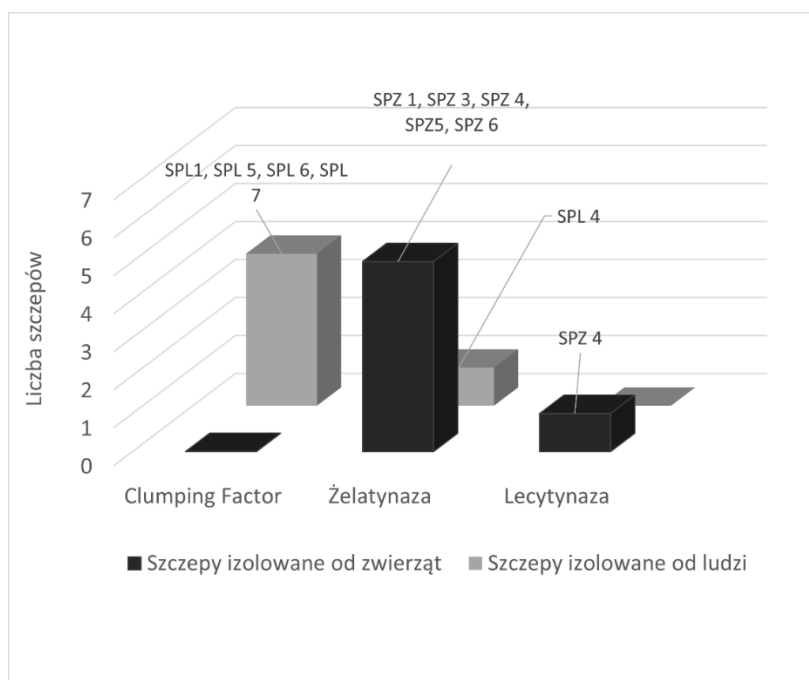
5.2.1.1. Zdolność do niszczenia tkanek i wytwarzanie koagulazy

Określono zdolności rozkładu białek i lipidów wskazujące na potencjał kolonizowania przez badane szczepy różnych środowisk. Kazeinaza występowała powszechnie u badanych szczepów pochodzących z materiałów klinicznych zarówno od zwierząt jak i ludzi. Żelatynazę wytwarzał jeden szczep wyizolowany od człowieka (SPL 4) i pięć zwierzęcych. Zdolności lipolityczne - wytwarzanie lecytynazy, wykazał tylko jeden szczep z materiału od zwierzęcia (SPZ 4). Esterazy nie zaobserwowano u żadnego z badanych. U wszystkich szczepów wykryto jednak gen *lip* kodujący lipazę.

Wszystkie badane szczepy *S. pseudintermedius* miały właściwości hemolityczne - powodowały hemolizę typu β , doprowadzając do całkowitego zniszczenia krwinek czerwonych.

Zbadano również obecność koagulazy wolnej jak i związanej z komórką bakterii (ang. *Clumping Factor*, CF) odpowiedzialnych m.in. za unikanie odpowiedzi immunologicznej gospodarza. Koagulazę wytwarzały wszystkie badane *S. pseudintermedius*, wszystkie też miały kodujący ją gen *coa*. Tylko część szczepów (4/7) wyizolowanych z materiałów klinicznych od ludzi miało CF.

Cechy różniące szczepy izolowane od ludzi i od zwierząt przedstawiono na Rycinie 16.



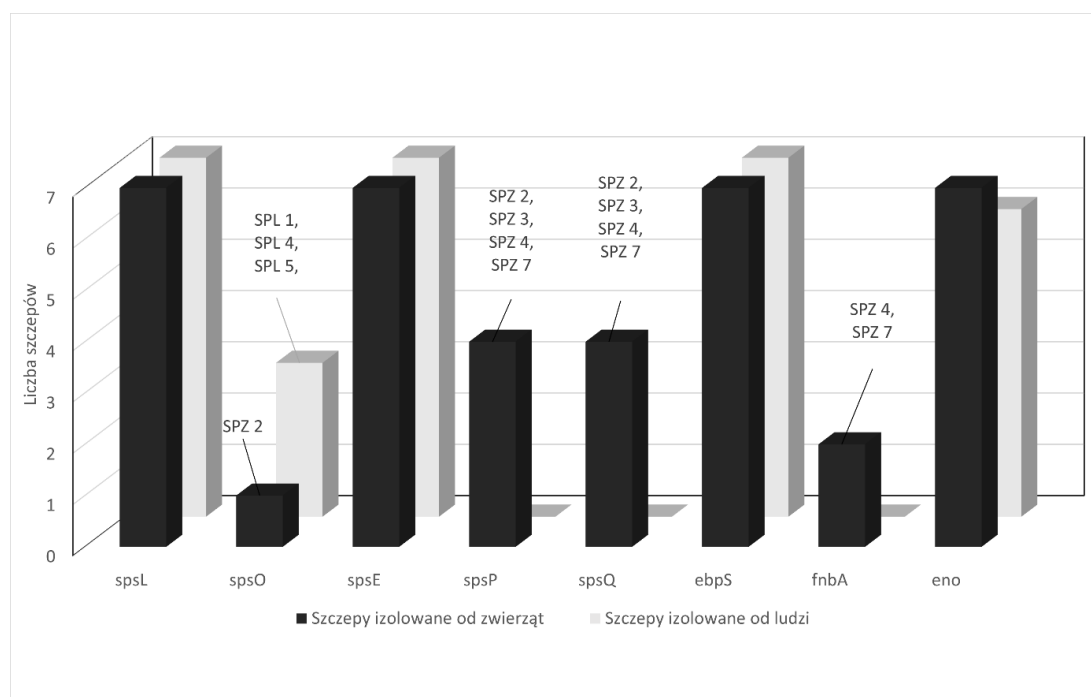
Rycina 16. Cechy różniące szczepy *S. pseudintermedius* izolowane od ludzi i zwierząt.

5.2.1.2. Geny kodujące białka biorące udział w kolonizacji organizmu człowieka

Poszukiwano genów kodujących MSCRAMM, które są odpowiedzialne za wiązanie macierzy zewnątrzkomórkowej gospodarza. Badane szczepy miały geny warunkujące przyleganie do elastyny, fibronektyny i fibrynogenu. Powszechne były geny *ebpS*, *spsL* oraz *spsE*, rzadziej występował gen *spsO* (SPL 1, SPL 4, SPL 5, SPZ 2). Kodujący zdolność wiązania lamininy gen *eno* miały wszystkie szczepy pochodzące z materiałów od zwierząt i sześć szczepów wyizolowanych od ludzi. Kodujący białko wiążące fibronektynę gen *fnbA* miały tylko SPZ 4 i SPZ 7.

Spośród innych genów opisywanych jako odpowiedzialne za wiązanie ECM u badanych szczepów nie wykryto tych kodujących białka wiążące fibronektynę genów *fnbB* i *spsD* ani genu białka wiążącego kolagen *cna*, sialoproteinę *bbp* czy fibrynogen *fib*.

Obecność genów białek wiążących ECM u badanych szczepów pokazano na Rycinie 17.



Rycina 17. Geny białek wiążących ECM u szczepów *S. pseudintermedius*.

Tworzenie biofilmu przez gronkowce *S. pseudintermedius* było wykazane w wielu pracach. W tych badaniach poszukiwano genów, które odpowiadają za kodowanie białek sprzyjających produkcji biofilmu: genu *bap* kodującego białko powierzchniowe zaangażowane w tworzenie biofilmu oraz genów operonu *ica* odpowiedzialnego za stymulację produkcji PIA. Pierwszego z nich nie wykryto u żadnego ze szczepów, natomiast wszystkie, zarówno te izolowane od zwierząt jak i od ludzi miały gen *icaD*.

5.2.2. Inwazja i toksyczność

Powszechność wytwarzania wolnej koagulazy sprzyjającej przeciwstawieniu się układowi immunologicznemu pokazano wyżej, niektóre szczepy wyizolowane od ludzi miały także CF.

Hamowanie aktywności układu immunologicznego gospodarza gronkowce mogą też osiągnąć między innymi poprzez niespecyficzne wiązanie immunoglobulin. W genomach badanych szczepów poszukiwano genów warunkujących ten proces - *spsP* i *spsQ*. Wykryto je tylko u 4/7 szczepów od zwierząt: SPZ 2, SPZ 3, SPZ 4, SPZ 7. Występowały one u nich tandemowo.

Poszukiwano także gronkowcowych genów kodujących leukotoksyny, eksfoliatyny oraz enterotoksyny. Zastosowanie specyficznych starterów *lukS* i *lukF* pozwoliło na wykrycie toksyny LukI przypominającej leukocydynę Panton-Valentine *S. aureus* u wszystkich badanych szczepów *S. pseudintermedius*, zarówno tych izolowanych od zwierząt jak i od ludzi. U wszystkich szczepów znaleziono także gen *siet* kodujący toksynę eksfoliatywną, toksynę o istotnym znaczeniu zarówno w przypadkach w przypadku piodermii jak i w przewlekłym zapaleniu ucha. U dwóch szczepów od ludzi (SPL 3, SPL 4) wykryto gen *exiA*. Gen *exiB* miały SPL 7 oraz SPZ 2. Geny enterotoksyn *sec* i *sed* wystąpiły tylko u szczepów izolowanych od ludzi (SPL 2, SPL 4, SPL 6, SPL 7). Nie stwierdzono obecności genów *sea* oraz *seb*.

5.2.3. Typowanie sekwencji multilocus

S. pseudintermedius jest już uznanym patogenem także i człowieka. Dlatego oceniono różnorodność genetyczną badanych szczepów, wykonując analizę MLST, aby móc porównać wyniki z innymi szczepami tego gatunku dotąd opisywanymi.

Sekwencje DNA wygenerowane na potrzeby tej analizy zostały zdeponowane w bazie GenBank pod następującymi numerami dostępu:

- dla genu *ack* OL378202-OL378215
- dla genu *cpn60* OL378216-OL378229
- dla genu *fdh* OL378230-OL378243
- dla genu *purA* OL378258-OL378271
- dla genu *pta* OL378244-OL378257
- dla genu *sar* OL378272-OL378285
- dla genu *tuf* OL372245-OL372258

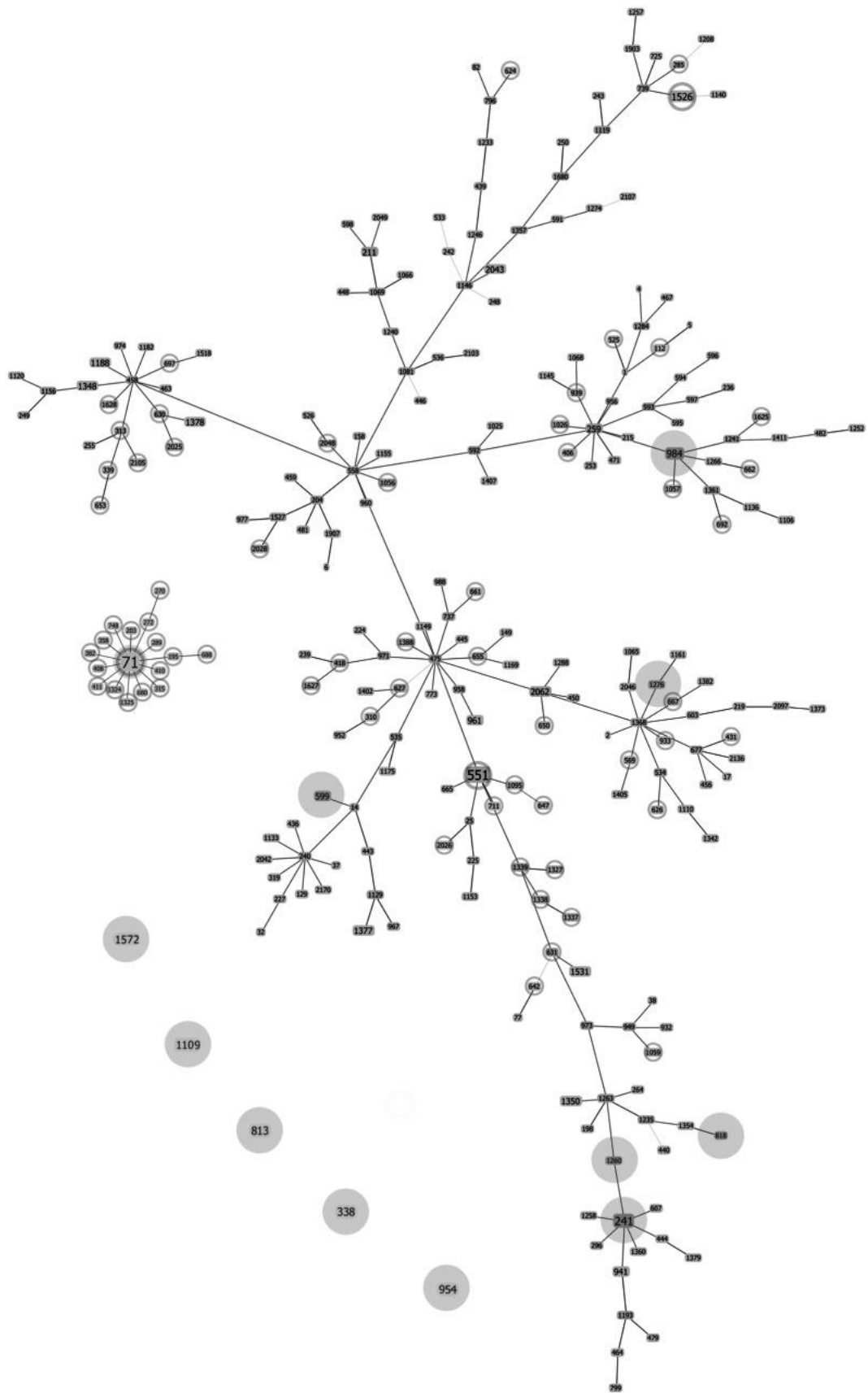
Wśród 14 badanych izolatów zidentyfikowano aż 12 typów sekwencyjnych. Wykryto wiele wariantów alleli w obrębie genu *ack*, *cpn*, *fdh*, *pta* i *purA*. Wśród sekwencji genu *sar* były to dwa warianty, w obrębie genu *tuf* jeden wariant alleli. Wyniki analizy wskazują na duże zróżnicowanie genetyczne i niski poziom klonalności badanych w tej pracy szczepów *S. pseudintermedius*, które wyizolowano

z próbek klinicznych z małego obszaru geograficznego. W Tabeli 22 zestawiono wyniki analizy MLST.

Tabela 22. Typy sekwencyjne uzyskane w analizie MLST.

Nr szczepu	Źródło szczepu	ST oparte o MLST-7	Loci i odpowiadające im allele						
			<i>ack</i>	<i>cpn60</i>	<i>fdh</i>	<i>pta</i>	<i>purA</i>	<i>sar</i>	<i>tuf</i>
SPL 1	Szczepy izolowane od ludzi	813	1	21	1	2	5	1	1
SPL 2		241	1	21	4	1	23	1	1
SPL 3		954	1	2	2	20	18	1	1
SPL 4		599	5	29	2	1	5	1	1
SPL 5		1572	1	11	4	75	5	1	1
SPL 6		984	1	2	2	1	3	2	1
SPL 7		984	1	2	2	1	3	2	1
SPZ 1	Szczepy izolowane od zwierząt	818	2	7	4	1	8	1	1
SPZ 2		1276	1	2	1	1	8	1	1
SPZ 3		338	1	10	2	4	2	1	1
SPZ 4		71	3	9	1	2	1	2	1
SPZ 5		1109	1	11	4	1	13	1	1
SPZ 6		1260	1	2	4	1	23	1	1
SPZ 7		71	3	9	1	2	1	2	1

Na Rycinie 18 przedstawiono zależności między uzyskanymi typami sekwencji u badanych szczepów *S. pseudintermedius* a tymi dotychczas zgłoszonymi w bazie danych PubMLST. Szare kropki wskazują na ST uzyskane w ramach tej pracy. Szare kółka to ST szczepów opornych na metycylinę. Powiązania genetyczne stwierdzono w przypadku siedmiu uzyskanych ST (ST71, ST241, ST599, ST818, ST984, ST1260, ST1276).



Rycina 18. Powiązania genetyczne pomiędzy uzyskanymi ST a występującymi na terenie Europy.

5.2.4. Poszukiwanie szczepów przelamujących barierę międzygatunkową

Wśród szczepów izolowanych od zwierząt wyróżnia się SPZ 2, który nie wytwarza żelatynazy, którą to cechę ma większość szczepów tej grupy. SPZ 2 ma również, jako jedyny z grupy szczepów pochodzących od zwierząt, gen *exi*. Szczepy izolowane od zwierząt charakteryzują się lepszymi zdolnościami niszczenia tkanek gospodarza a także lepszym przystosowaniem do walki z jego układem immunologicznym niż te wyizolowane od ludzi. Szczep SPZ 4 obok dobrego przystosowania do niszczenia tkanek, miał potencjalną zdolność zwalczania aktywności układu immunologicznego gospodarza dzięki obecnym genom *spsP* i *spsQ*.

W grupie szczepów izolowanych od ludzi SPL 1 i SPL 5 nie miały genów enterotoksyn, genów *exi*, które to były obecne u pozostałych szczepów tej grupy.

5.2.5. Lekooporność badanych szczepów *S. pseudintermedius*

Zbadano oporność badanych *S. pseudintermedius* na antybiotyki pod kątem możliwości terapeutycznych w przypadku wystąpienia zakażeń spowodowanych szczepami tego gatunku ludzi. Zastosowano metodę dyfuzyjno-krażkową wobec kilku grup terapeutycznych a także poszukiwano genów oporności na antybiotyki β -laktamowe.

W grupie szczepów izolowanych od zwierząt dwa były metycylinoporne (SPZ 4, SPZ 7). W genomach obu tych szczepów obecne były geny *mecA* kodujące brak wrażliwości na całą grupę β -laktamów. Szczepy te należały do jednego typu sekwencyjnego MLST ST71.

Wszystkie szczepy pochodzące z materiałów od zwierząt były zdolne wytwarzać penicylinazy i tym samym były odporne na penicyliny, wykryto u nich gen *blaZ*. W grupie szczepów izolowanych od ludzi cztery (SPL 1, SPL 2, SPL 4, SPL 5) wykazały oporność wobec penicylin i miały gen *blaZ*. Geny *mecA* i *blaZ* nie wystąpiły u szczepów wrażliwych na β -laktamy.

Zbadano wrażliwość szczepów metycylinoopornych na wankomycynę oraz daptomycynę metodą MIC z wykorzystaniem E-testów. W Tabeli 23 zestawiono wyniki. Oba z badanych szczepów wykazały wrażliwość wobec antybiotyku gliko- oraz lipopeptydowego. Wartości stężeń granicznych dla wankomycyny i daptomycyny wynoszą kolejno 4 μ g/ml oraz 1 μ g/ml.

Tabela 23. Wrażliwość szczepów metycylinoopornych na wankomycynę i daptomycynę.

Nr szczepu	Wartość MIC wankomycyny	Wartość MIC daptomycyny
SPZ 4	0,75 µg/ml	0,19 µg/ml
SPZ 7	0,5 µg/ml	0,094 µg/ml

Oporność na tetracykliny wystąpiła u dwóch szczepów izolowanych z materiałów od ludzi (SPL 1, SPL 5), towarzyszyła im jednocześnie oporność na penicyliny. Wśród *S. pseudintermedius* od zwierząt oporność na tę grupę terapeutyczną wykazano u pięciu z nich.

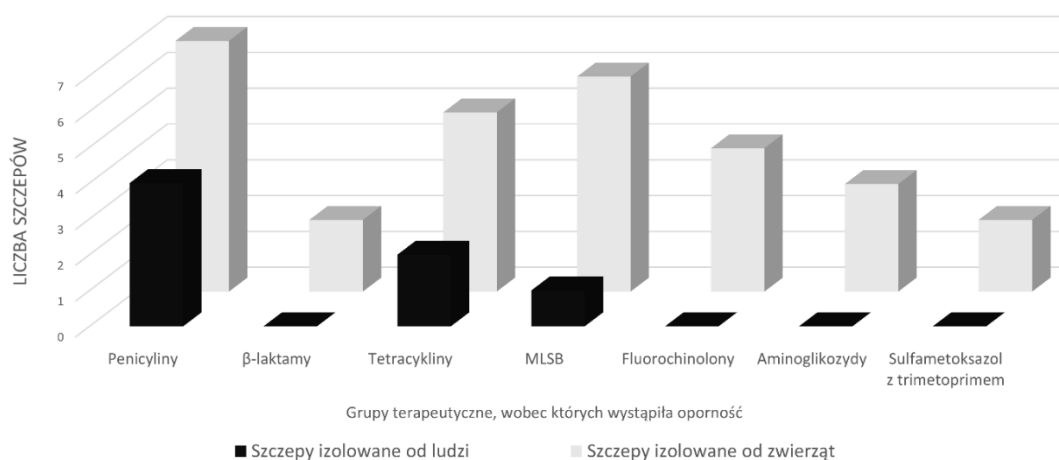
Wśród szczepów izolowanych od zwierząt często występowała oporność typu cMLS_B. W grupie szczepów od ludzi oporność tego typu wystąpiła tylko u SPL 2.

Szczepy pochodzące z materiałów od zwierząt (SPZ 2, SPZ 3, SPZ 4, SPZ 7) były odporne na fluorochinolony. Oporność na aminoglikozydy również wykryto tylko wśród szczepów tej grupy. Szczepy, które wykazały brak wrażliwości wobec gentamicyny to SPZ 3, SPZ 4, SPZ 7.

Szczepy metycylinooporne wykazały oporność także wobec sulfametoksazolu z trimetoprimem. SPZ 4 i SPZ 7 były odporne na największą liczbę antybiotyków.

Wszystkie szczepy badane wykazały wrażliwość wobec rifampicyny oraz połączenia streptogramin – chinupristyny z dalfopristyną.

Szczepy pochodzące z materiałów klinicznych od zwierząt były bardziej odporne niż te izolowane od ludzi. W przypadku infekcji przez nie wywołanej możliwości terapeutyczne są niewielkie. Dane dotyczące oporności w obu grupach badanych przedstawiono na Rycinie 19.



Rycina 19. Oporność na antybiotyki badanych szczepów *S. pseudintermedius*.

6. Dyskusja

Podstawową cechą odróżniającą organizmy prokariotyczne od Eucarya jest zmienność. Każda nowa komórka powstająca z poprzedniej, najczęściej w odstępach minutowych, może dać początek klonu o nowych właściwościach, który dzięki presji selekcyjnej środowiska może się stać początkiem nowego postrzegania gatunku, do którego go klasyfikowano. Właśnie zmienność leży u podstaw teorii zaproponowanej przez Wolfe (Wolfe et al., 2007) a jego schemat drabiny, po której wspinają się drobnoustroje, by osiągnąć możliwość powodzenia infekcji u człowieka, jest bardzo inspirująca. Ta praca doktorska powstała w wyniku tej inspiracji, obok szeregu innych badań na ten temat, które ostatnio są prowadzone na świecie. Drabina Wolfe jest jednak jedynie drogowskazem dla badaczy, bowiem drobnoustroje, w różnym tempie, zmieniają się same, nie przestrzegając reguł. Na tle tych spostrzeżeń nasuwają się rozważania nad pojęciem gatunku, losów taksonomii poszczególnych grup bakterii i znaczenia badania bakteryjnej filogenezy (Shapiro et al., 2016).

Badania tej rozprawy dotyczą dwóch rodzajów ziarenkowców gramdodatnich. W obu tych rodzajach jest gatunek, którego adaptacja do organizmu człowieka wielokrotnie została wykazana, a który jest częstą przyczyną poważnych niekiedy chorób człowieka. To *Streptococcus pyogenes* i *Staphylococcus aureus*. Taksonomia, oprócz nich, umieściła w reprezentowanych przez nie rodzajach dziesiątki innych gatunków, które preferują innych niż człowiek gospodarzy. Przyglądanie się zmianom cech tych gatunków i rozważanie, na ile mogą one świadczyć o przemieszczaniu się na drabinie Wolfa, jest przedmiotem przedstawionych tu badań.

Patogeneza zakażeń wywoływanych przez paciorkowce jest procesem bardzo złożonym. Wiele jej elementów pozostaje nadal niepoznanych. Najlepiej pod tym względem scharakteryzowany gatunek to *S. pyogenes*. Jest on gatunkiem, dla którego człowiek jest naturalnym i wyłącznym gospodarzem (Molloy et al., 2011). Jego potencjał chorobotwórczy wiązany jest z kilkudziesięcioma różnymi cechami podlegającymi złożonej regulacji (Siemens & Lutticken, 2021). Wobec różnorodności pod względem przebiegu i ciężkości zakażeń wywoływanych przez ten gatunek, a jednocześnie wobec filogenetycznej bliskości pozostałe gatunki są analizowane głównie przez porównywanie ich czynników chorobotwórczości do tych opisanych u niego (Babbar et al., 2018; Burova & Artem, 2022) Przyglądając się tym gatunkom można sądzić, że każdy z nich, jakkolwiek mocno byłby związany z jednym gospodarzem, może stać się patogenem człowieka. Jednocześnie ze względu na, w większości, skomplikowaną lub niejednoznaczną identyfikację istnieje trudność w określeniu częstości występowania paciorkowców zwierzęcych jako czynników etiologicznych zakażeń ludzi.

Geny warunkujące wytwarzanie czynników sprzyjających kolonizacji i inwazji czy też toksyczności, które pierwotnie opisano u *S. pyogenes* a potem i u *S. dysgalactiae* są przez wielu badaczy poszukiwane u innych gatunków

paciorkowców. Ich obecność świadczy o potencjale wytwarzania odpowiednich białek i pozwala rozumieć mechanizmy ich chorobotwórczości. Wykorzystane w tej rozprawie sekwencje startowe pochodziły właśnie od tych dwóch gatunków (Metody, rozdz. 4.1.4.3, Tabela 2 i Tabela 3). Tabela 24 pokazuje zestawione dane, przede wszystkim w oparciu o zapisy z bazy GenBank oraz literatury (Fessia & Odierno, 2021; Goodfellow et al., 2000; Holden et al., 2009; Lannes-Costa et al., 2021; McKenna et al., 2022; Ramachandran et al., 2004; Sayers et al., 2022), pokazujące u jakich gatunków znajdowano już wcześniej poszukiwane geny z użyciem starterów zastosowanych w tej pracy, a u jakich paciorkowców znajdowano kodowane przez nie cechy, ale w oparciu o inne sekwencje, zwykle bardzo pokrewne. Warto zaznaczyć, że do bazy GenBank zgłaszane są zazwyczaj dane dotyczące pojedynczych szczepów, a każdy kolejny wpis jest cennym wkładem w poznanie drobnoustrojów. Większość dostępnych danych dotyczy gatunku *S. agalactiae* czy *S. pneumoniae*, czyli dobrze ugruntowanych patogenów człowieka a także *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis*. Niewiele informacji w kontekście poszukiwanych genów przedstawionych w Tabeli 24 dotyczyło *S. gallolyticus*.

Tabela 24. Geny poszukiwane w ramach tej pracy obecne u innych gatunków paciorkowców.

Nazwa genu	Kodowany czynnik/cecha	Pochodzenie sekwencji	Gatunki paciorkowców, u których znaleziono gen z użyciem sekwencji przedstawionej w ramach tej pracy	Inne gatunki, u których znaleziono ten gen
<i>cbp</i>	białko wiążące kolagen	<i>S. dysgalactiae</i>	<i>S. equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i> , <i>S. uberis</i>	<i>S. pyogenes</i> , <i>S. agalactiae</i> , <i>S. suis</i> , <i>S. pneumoniae</i>
<i>fbp</i>	białko wiążące fibronektynę			
<i>gapC</i>	dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego			
<i>hylB</i>	hialuronidaza			
<i>lmb</i>	białko wiążące lamininę	<i>S. pyogenes</i>	<i>S. agalactiae</i> , <i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i> , <i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>dysgalactiae</i>	<i>S. anginosus</i> , <i>S. suis</i> , <i>S. pneumoniae</i> , <i>S. uberis</i> , <i>S. mutans</i> , <i>S. gallolyticus</i>
<i>isp1</i>	udział w tworzeniu biofilmu, białko immunogenne			
<i>prtF1</i>	białko wiążące fibronektynę	<i>S. pyogenes</i>	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i> , <i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>dysgalactiae</i>	<i>S. gordonii</i> , <i>S. mutans</i> , <i>S. sanguinis</i> , <i>S. equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i>
<i>prtF2</i>				
<i>sla</i>	fosfolipaza A2	<i>S. pyogenes</i>	<i>S. dysgalactiae</i> , <i>S. equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i>	<i>S. equi</i> subsp. <i>equi</i>
<i>sua</i>	cząsteczka adhezyjna SUAM	<i>S. uberis</i>	<i>S. parauberis</i>	-
<i>mtuA</i>	antygeny receptora lipoproteinowego	<i>S. uberis</i>	-	<i>S. iniae</i> , <i>S. downei</i>
<i>sdn</i>	streptodornaza	<i>S. pyogenes</i>	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i> , <i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>dysgalactiae</i>	<i>S. equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i> , <i>S. equi</i> subsp. <i>equi</i> , <i>S. agalactiae</i> ,

				<i>S. salivarius</i> , <i>S. intermedius</i> , <i>S. pseudoporcinus</i> , <i>S. porcinus</i> , <i>S. iniae</i>
<i>spdI</i>	paciorkowcowa DNaza I			<i>S. pneumoniae</i> , <i>S. suis</i> , <i>S. equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i> , <i>S. equinus</i> , <i>S. agalactiae</i> , <i>S. parauberis</i> , <i>S. uberis</i> , <i>S. iniae</i> , <i>S. porcinus</i>
<i>ska</i>	streptokinaza	<i>S. pyogenes</i>	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i> , <i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>dysgalactiae</i>	<i>S. equi</i> subsp. <i>equi</i> , <i>S. equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i> , <i>S. equinus</i> , <i>S. uberis</i> , <i>S. parauberis</i> , <i>S. agalactiae</i> , <i>S. pseudoporcinus</i> , <i>S. porcinus</i>
<i>sagA</i>	streptolizyna S	<i>S. pyogenes</i>	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i> , <i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>dysgalactiae</i>	<i>S. agalactiae</i> , <i>S. pneumoniae</i> , <i>S. canis</i> , <i>S. pseudoporcinus</i> , <i>S. iniae</i> , <i>S. suis</i> , <i>S. mitis</i> , <i>S. anginosus</i> , <i>S. infantis</i> , <i>S. oralis</i> , <i>S. gallolyticus</i> , <i>S. equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i>
<i>slo</i>	streptolizyna O	<i>S. pyogenes</i>	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i> , <i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>dysgalactiae</i>	<i>S. pneumoniae</i> , <i>S. canis</i>
<i>scp</i>	peptydaza C5a układu dopełniacza	<i>S. pyogenes</i>	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i> , <i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>dysgalactiae</i> , <i>S. agalactiae</i> , <i>S. pneumoniae</i>	<i>S. salivarius</i> , <i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i>
<i>sicG</i>	paciorkowcowy inhibitor dopełniacza	<i>S. dysgalactiae</i>	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i> , <i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>dysgalactiae</i>	<i>S. pyogenes</i>
<i>dppA</i>	permeaza dipeptydowa	<i>S. pyogenes</i>	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i> , <i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>dysgalactiae</i>	<i>S. agalactiae</i> , <i>S. pneumoniae</i> , <i>S. sanguinis</i>

W rodzaju *Streptococcus* wiele gatunków bytuje jako komensale jednego czy kilku gospodarzy, w tym człowieka. Gatunki te mogą powodować nie tylko infekcje oportunistyczne, ale także infekcje organizmów immunokompetentnych. Poza gatunkami charakterystycznymi dla infekcji ludzkich, takimi jak *S. pneumoniae*, *S. pyogenes* czy *S. agalactiae*, lista paciorkowców powodujących zakażenia u ludzi ulega powiększaniu. Nowymi patogenami, które powodują infekcje u człowieka są m. in. β -hemolizujące *S. canis*, *S. iniae*, *S. equi* subsp. *zooepidemicus*. Inne gatunki to nie- β -hemolizujące *S. halichoeri*, *S. suis* oraz powodujące różne typy hemolizy szczepy *S. dysgalactiae* (Spickler, 2020). Wśród omawianych w ramach niniejszej rozprawy gatunków paciorkowców wiele z nich ma czynniki wirulencji występujące u *S. pyogenes* (Brouwer et al., 2016; Turner et al., 2019). W przypadku bakterii podgatunku *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* wskazuje się na 70% pokrycie genowe z *S. pyogenes* (Turner et al., 2019; Watanabe et al., 2016). Ciągłe nie wiadomo jednak, które z nich są decydujące przy pokonywaniu bariery gatunkowej między zwierzętami a człowiekiem.

Szerokie omówienie gatunków paciorkowców stanowiących zagrożenie dla człowieka zawarte zostało we własnej pracy przeglądowej omawiającej ich patogenność i problemy związane z pojawiającą się wśród nich opornością (Głajzner et al., 2021). Poza przedstawionymi w ramach tej pracy doktorskiej omówiono w niej również *S. equi*, *S. iniae*, *S. canis*, *S. suis* i inne gatunki kompleksu SBSEC. W pracy zwrócono uwagę na występowanie w ich genomach czynników wirulencji, które mogą umożliwić im rozwój w nowych środowiskach. Pokazano również stosowane w tych infekcjach antybiotyki oraz pojawiające się przypadki obniżonej wrażliwości na β -laktamy. Mnogość gatunków zwierzęcych paciorkowców powodujących pojawiające się z różną częstością zakażenia u ludzi wskazuje na zdolność do zmian w genomie oraz zyskiwania nowych żywicieli (Głajzner et al., 2021).

Spośród opisanych w tej pracy przeglądowej gatunków do badań wybrano pięć i dla każdego tego wyboru widziano uzasadnienie. Wśród wybranych znalazły się szczepy *S. gallolyticus* dwóch podgatunków. Zmiana metabolomu gatunków grupy Bovis ma wpływ na rozwój chorób nie tylko infekcyjnych, ale także nowotworów (Butt et al., 2018). Jeden badany szczep tego kompleksu a badany *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* pochodził z infekcji krwi, co związane jest z większym prawdopodobieństwem z translokacją i wystąpieniem nowotworu jelita grubego (Gherardi et al., 2016). Szczepy *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus* opisywane są w pracach klinicznych jako przyczyna zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych a ich obecność w mikrobiocie wiązana jest z ryzykiem wystąpienia nowotworu dróg żółciowych (Li et al., 2019). Niewiele jest opisów przypadków zakażenia ran przez *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus* (Corredoira et al., 2014). Włączenie *S. gallolyticus* do grupy badanych w tej rozprawie doktorskiej szczepów stworzyło nową, niezależną ścieżkę badań, gdyż, jak się okazało, ten gatunek nie wpisuje się w mechanizmy chorobotwórczości drugiego z gatunków izolowanego od ludzi w tych badaniach *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis*. Nie można go także porównywać z badanymi szczepami izolowanymi od bydła. Z tych powodów analiza wyników dotyczących *S. gallolyticus* zostanie przedstawiona osobno.

Dużą grupę szczepów stanowiły *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* (SDSE), które wchodzi już w skład mikrobiota człowieka (Yung et al., 2019). Badano również szczepy drugiego podgatunku, *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* (SDSD). SDSE wyizolowane były z infekcji ran, gardła czy pochwy. Pojedyncze szczepy wyizolowano z jamy otrzewnej i aspiratu, Takie źródła izolacji szczepów tego podgatunku wskazują też źródła literaturowe chociaż, SDSE izolowano także z ciężkiego martwiczego zapalenia powięzi, zapalenia wsierdzia, paciorkowcowego wstrząsu toksycznego czy bakteriemii (Rodriguez-Munoz et al., 2019; Yung et al., 2019). Także w przypadku SDSD opisywano infekcje u człowieka spowodowane przez ten podgatunek, natomiast ich liczba może być niedoszacowana ze względu na utrudnioną identyfikację do podgatunku (Chennapragada et al., 2018).

Częstymi czynnikami etiologicznymi infekcji zwierząt gospodarskich są *S. uberis*. Badane szczepy *S. uberis* i *S. parauberis* pochodziły z przypadków zapalenia wymion u krów. Ten gatunek też izolowano już od człowieka, chociaż informacje o tym są nieliczne. Nie sposób jednak nie zauważyć, że jeśli *S. uberis* mają potencjał infekcyjny w stosunku do ludzi, to stanowią zagrożenie, zwłaszcza dla hodowców, a niewielka liczba izolacji może wynikać z trudnej diagnostyki, co pokazano też w ramach tej rozprawy (Meriglier et al., 2018).

Śledzenie występowania nowych cech wśród zwierzęcych paciorkowców może pomóc ocenić nowe potencjalne zagrożenie ze strony tych powodujących rzadkie zakażenia u człowieka. Prace pogłębiające wiedzę na temat patogenyzy wywoływanych przez paciorkowce zakażeń pozwalają na zbieranie danych, które mogą pokazać przemianę w kierunku nowego gospodarza i pomóc odpowiedzieć na pytanie, które elementy w tym procesie są kluczowe. Badania własne pokazują, jak trudne jest to zadanie.

6.1. Identyfikacja badanych szczepów *S. dysgalactiae* i *S. uberis*

Spośród wybranych do badań gatunków najczęściej prac poświęconych jest *S. dysgalactiae*. Gatunek ten zaliczony jest do paciorkowców ropotwórczych, a filogenetycznie wykazuje podobieństwo do paciorkowców grupy B. Kiedy okazało się, że jest on bardzo niejednorodny, Vandamme zaproponował dokonanie podziału na dwa podgatunki *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* oraz *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* (Vandamme et al., 1996). Kryteria tego podziału jednak od początku wzbudzały wątpliwości. Vandamme zaproponował bowiem, aby szczepy izolowane od zwierząt uznać za SDSD a od ludzi za SDSE. Dodatkowym kryterium tego podziału miał być typ hemolizy. Hemolizę β przypisał szczepom „ludzkim”, a pozostałe rodzaje lub jej brak szczepom od zwierząt. Kolejną cechą, którą Vandamme uznał za w sposób pewny odróżniającą podgatunek „ludzki” była zdolność wytwarzania streptokinazy aktywnej w stosunku do plazminogenu ludzkiego oraz aktywność proteolityczna w stosunku do ludzkiej fibryny. Fenotypową charakterystykę podgatunków poszerzyli Vieira i wsp. (Vieira et al., 1998). Jednak już wkrótce inni badacze zaczęli wskazywać na szczepy, które nie sprostały tym fenotypowym kryteriom, bowiem szczepy zidentyfikowane genetycznie w oparciu o sekwencjonowanie 16S rRNA jako należące do tych podgatunków izolowano od różnych gospodarzy (Acke et al., 2015; Koh et al., 2009; Zhao et al., 2020). Jednocześnie w wielu pracach, w których identyfikację opierano na fenotypie, fałszywie przypisywano cechy chorobotwórczości niewłaściwym podgatunkom, co do dzisiaj ma konsekwencje, gdy chce się oceniać wyniki dotyczące wielu szczepów, pochodzące z różnych ośrodków badawczych. Niepewność, jaką niesie powszechnie stosowana w laboratoriach klinicznych identyfikacja fenotypowa paciorkowców rzadko izolowanych od ludzi, pokazują badania własne. Znamienne jest, że w czasie identyfikacji szczepów badanej kolekcji szczep SDSD 431 fenotypowo zakwalifikowany został do *S. uberis*, a trzy inne SDSD

jako SDSE. Identyfikacja metodami fenotypowymi *S. uberis* także okazała się trudna i wymagała zastosowania metod genetycznych. Szczepy *S. uberis* zidentyfikowane były fenotypowo jako *S. porcinus* i *S. agalactiae*. To wskazuje na bliskość gatunków paciorkowców, a jednocześnie usprawiedliwia przyjęte w tej pracy porównywanie między sobą cech różnych gatunków. Wiele wskazuje na to, że jedynie identyfikacja molekularna pozwala na pewne przyporządkowanie do podgatunku. Jednocześnie jednak zmienność w obrębie pangenomu gatunku zaciera także oparte na genomie różnice, które pozwalają jednoznacznie takiego podziału dokonywać.

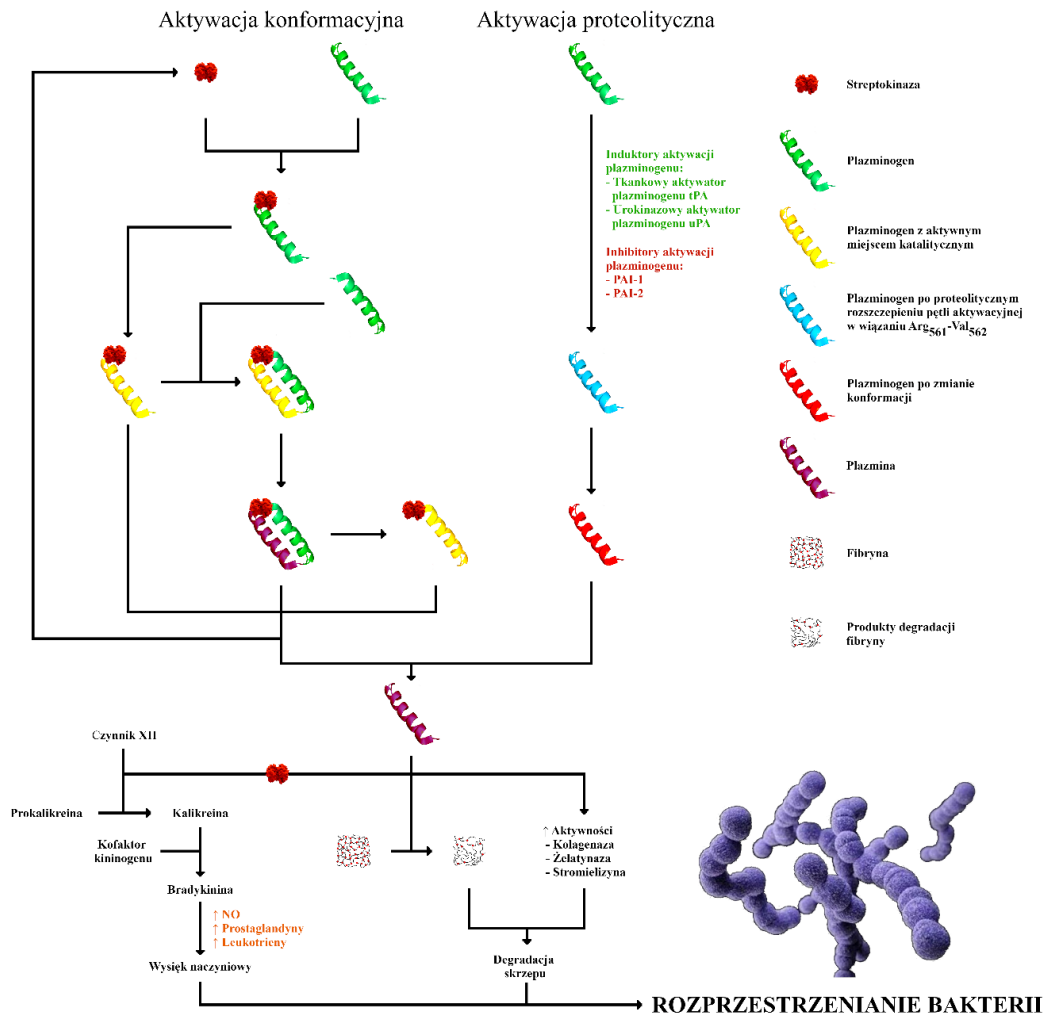
6.2. Poszukiwanie cech istotnych dla patogenyzy zakażeń badanymi paciorkowcami

Przyglądając się własnym wynikom przedstawionym w tej pracy, rozróżnienie w obrębie tych szczepów *S. dysgalactiae*, które w niej badano, uwzględniające gospodarza, od którego szczep wyizolowano i typ hemolizy może wydać się zasadne. Ale już analiza zdolności do wytwarzania streptokinazy pokazała, że to kryterium zależy od przyjętej metody. Aktywacja plazminogenu przez paciorkowce wiązana jest bardzo ściśle z jego inwazyjnością, dlatego została ona zbadana w tej pracy wielokierunkowo. W tych badaniach pokazano, że jest to cecha podlegająca zmienności i dotyczy wielu gatunków tego rodzaju. Aktywność streptokinazy wykazano nie tylko w przypadku szczepów izolowanych z materiałów od ludzi. Streptokinaza szczepów izolowanych od bydła była natomiast aktywna wobec plazminogenu zwierzęcego, ale i ludzkiego. Dodatkowo szczepy izolowane z materiałów od ludzi nie w każdym przypadku wykazały aktywność wobec plazminogenu ludzkiego.

Streptokinaza jest uważana za jeden z najważniejszych czynników warunkujących inwazyjność paciorkowców. Specyficzność *S. pyogenes* dla ludzkiego gospodarza wiązana jest między innymi właśnie z wydzielaniem streptokinazy. Wykrywano ją dotąd tylko u paciorkowców z grup C, G i A. Jest ona polipeptydem, zbudowanym z α -, β -, γ -domeny, przy czym domeny α i γ charakteryzują się 85% identycznością sekwencji (Lizano & Johnston, 2005). Streptokinazy z izolatów od ludzi tych grup wykazują większą homologię względem siebie niż te z izolatów zwierzęcych grup C i G (Turner et al., 2019). Caballero i wsp. stwierdzili, że homologia aminokwasów między streptokinazami z pochodzących od ludzi i od zwierząt izolatów SDSE wynosi zaledwie 35% (Caballero et al., 1999). Zdolność streptokinaz do rozszczepiania plazminogenu może zatem być krytycznym czynnikiem w określaniu zakresu żywicieli poszczególnych szczepów paciorkowców (Lizano & Johnston, 2005; Schroeder et al., 1999; Turner et al., 2019).

Na Rycinie 20 przedstawiono uproszczony mechanizm aktywacji plazminogenu z udziałem streptokinazy. Jest on mechanizmem wirulencji charakterystycznym i krytycznym dla patogenyzy inwazyjnej. Pokazano także mechanizm naturalny zachodzący z udziałem obecnych w ustroju aktywatorów

plazminogenu (Cook et al., 2012; Huish et al., 2017; Ismail et al., 2022; Lizano & Johnston, 2005; Nitzsche et al., 2015).



Rycina 20. Aktywacja plazminogenu z udziałem i bez udziału streptokinazy.

Plazminogen stanowi zymogen z pięcioma domenami oraz domeną katalitycznej proteiny serynowej. W wyniku połączenia cząsteczki streptokinazy z plazminogenem nie dochodzi jednak do rozszczepienia wiązania peptydowego. Mechanizm działania tego połączenia związany jest z aktywacją konformacyjną cząsteczki oraz ekspresją aktywnego miejsca katalitycznego. Tworzy się kompleks streptokinaza-plazmina zdolny do aktywacji innych cząsteczek plazminogenu. Konsekwencją tego procesu jest uwolnienie plazminy - proteiny serynowej odpowiedzialnej za rozpuszczanie skrzepów fibrynowych. Paciorkowce wykorzystują ten proces aktywacji do rozprzestrzeniania się w organizmie gospodarza poprzez pokonywanie barier fibrynowych. Dzięki obecności streptokinazy dochodzi też do niekontrolowanej dodatkowej aktywności plazminy, która nie zostaje zahamowana przez α 2-antyplazminę, co ma miejsce w warunkach fizjologicznych (Huish et al., 2017; Nitzsche et al., 2015), gdy dzięki działaniu tkankowego lub urokinazowego

aktywatora plazminogenu (tPA, uPA) dochodzi do proteolitycznego rozszczepienia plazminogenu i uwolnienia plazminy. Plazmina aktywowana dzięki obecności tPA czy uPA jest wrażliwa na działanie α 2-antyplazminy (Ismail et al., 2022).

Wykazano, że *S. pyogenes* może wytwarzać kilka allelicznych odmian streptokinazy (Keramati et al., 2020; Verhamme et al., 2015). W badaniach własnych opisano takie szczepy, które dokonywały aktywacji plazminogenu ludzkiego nie wykazując jednocześnie ekspresji genu *ska* (SDSE 159, SDS 350). Zdaniem Verhamme i wsp. (Verhamme et al., 2015) obecność u różnych szczepów tego gatunku wariantów allelicznych genu *ska* wskazuje na selektywną presję środowiska nowego gospodarza, która może doprowadzać do zmian pozwalających uwzględnić różnice w mechanizmach szlaków ich aktywacji. Tak można też ocenić otrzymane wyniki własne. Pokazują one ponadto, że taka presja dokonywana jest nie tylko w badanym przez Verhamme genie streptokinazy szczepu SDSE, ale i w przypadku innych gatunków paciorkowców. W badaniach własnych zwracają uwagę szczepy SDSE izolowane od ludzi, które obok zdolności aktywacji plazminogenu ludzkiego mają, czy może zachowały, znaczny potencjał wykorzystania plazminogenu bydlęcego.

Obok streptokinazy, wśród czynników promujących inwazję *S. pyogenes* wymieniana jest często hialuronidaza (Lo & Cheng, 2015; Lother et al., 2017). W tkankach ludzkich hialuronian jest kluczowym składnikiem macierzy pozakomórkowej w skórze i innych tkankach. Jego obecność w miejscach urazu skóry wspomaga gojenie się ran (Frenkel, 2014). Rozkład hialuronianu przez bakterie dostarcza im energii, a jednocześnie umożliwia rozprzestrzenianie się infekcji (Britton et al., 2015). Udział SDSE w zakażeniach ran może być związany właśnie z aktywnością hialuronidazy (Nguyen et al., 2020). U szczepów SDSE znaleziono gen *hylB*, który jest homologiczny do genu hialuronidazy u *S. agalactiae* (Shimomura et al., 2011). Liaza hialuronianowa paciorkowców tego gatunku jest uznanym czynnikiem wirulencji w zakażeniach człowieka. Wpływa na przeżycie wewnątrzkomórkowe komórek bakterii jak i zwiększoną ekspresję cytokin prozapalnych. Wytwarzana przez paciorkowce zwierzęce ma wpływ na rozwój zapalenia wymion (Kolar et al., 2015; Xu et al., 2021). W badaniach własnych gen *hylB* wykryto u większości szczepów SDSE izolowanych od ludzi, ale nie u wszystkich - nie miały go m.in. szczepy wyizolowane z przypadków zapalenia ucha. Gen ten miał także jeden ze szczepów wyizolowanych od bydła – SDS 350, obdarzony także innymi cechami przypisywanymi zwykle szczepom od ludzi SDSE (Tabela 19).

Po rozdzieleniu *S. dysgalactiae* na podgatunki wiele prac dotyczyło zakażeń przez nie wywoływanych (Chennapragada et al., 2018; Koh et al., 2020; Nathan et al., 2021). Pracują nad nimi między innymi dwa duże zespoły badawcze - w Japonii i w Portugalii. Zespół japoński badając zwierzęce gatunki paciorkowców, kilka prac poświęcił *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis*. Opisywane są w nich przypadki

inwazyjnych zakażeń tym podgatunkiem, a autorzy przypisują im czynniki chorobotwórczości za nie odpowiedzialne, w tym hemolizyny O i S, streptokinazę, hialuronidazę i peptydazę C5a (Takahashi et al., 2011). Takahashi i wsp. (Takahashi et al., 2017) zwrócili uwagę na znaczenie dla chorobotwórczości tego podgatunku paciorkowcowego inhibitora dopełniacza SicG, który jest uważany za ligand białek C6 i C7 dopełniacza hamujący jego atak na membranę cytoplazmatyczną komórek i tym samym blokujący ich lizę. Co więcej produkt genu *sicG* hamuje działanie przeciwbakteryjnego peptydu LL-37 obecnego w pocie na skórze człowieka, co sugeruje, że szczepy go posiadające łatwiej mogą ją kolonizować. Autorzy wskazali niedużą częstość występowania tego genu, a jednocześnie na znaczącą inwazyjność mających go szczepów. Jednocześnie wykazali oni obecność tego genu u szczepu SDSE izolowanego od zwierzęcia (psa). Podkreślali możliwość transferu tego szczepu SDSE między człowiekiem a zwierzęciem i oceniali znaczenie epidemiologiczne tego faktu. W badaniach własnych gen *sicG* znaleziono tylko u trzech szczepów podgatunku SDSE. Dwa z nich (izolowany z odleżyny SDSE 387 i z wymazu z pochwy SDSE 3674) znalazły się wśród szczepów wskazanych w Tabeli 20 (Wyniki, rozdz. 5.1.5) wybranych ze względu na zachowane podobieństwo badanych tu szczepów od ludzi do tych wyizolowanych od zwierząt. Ten przykład wskazuje ogromną bliskość szczepów podgatunku SDSE i tych zwierzęcych, od których bez wątpienia się wywodzą.

Izolacji i charakterystyce oporności jak też ich klonalnemu rozprzestrzenianiu SDSE poświęcono wiele prac, a w 2022 r. opisano, jak twierdzą autorzy tej pracy, pierwszy przypadek przenoszenia tego patogenu w obrębie rodziny (Sunagawa et al., 2022). W przypadku tego patogenu można by zatem uznać, że oto wyjściowy *S. dysgalactiae* po przejściu szeregu przemian, z których część dała mu możliwość zakażenia człowieka, co zakwalifikowało go do podgatunku SDSE, przechodzi na kolejny etap drabiny ewolucyjnej przekształcania się w patogen coraz bardziej ludzki (poziom trzeci wg Wolfe; Wstęp, rozdz. 1.1.4). Jednak odpowiedź na pytanie, które z cech, jakie miał na początku tej drogi, uległy zmianie lub co zyskał ten konkretny szczep, nie została udzielona. Takie badania są bardzo trudne, a czasem niemożliwe do wykonania. W wielu pracach cechy określonych szczepów łączone są z przynależnością do określonych grup *emm*, a także podejmowane są badania molekularne polegające na sekwencjonowaniu całych genomów. Z pewnością takie badania wymienionych wyżej szczepów własnych byłyby zasadne.

Postęp metod badawczych, które poprzez sekwencjonowanie całych genomów pozwalają na poszukiwanie związków filogenetycznych i sekwencji określonych genów, stwarza nowe możliwości poznawcze. Do takich technik sięgnął zespół portugalski zajmujący się w obrębie gatunku *S. dysgalactiae* cechami szczepów od ludzi i zwierząt, z podziałem na te izolowane od bydła i te od innych zwierząt (psów, ryb) (Alves-Barroco, Brito, et al., 2022). Badania tego dużego zespołu pracującego od

kilku lat nad patogenezą *Streptococcus dysgalactiae* na uniwersytecie w Lizbonie obejmują różne aspekty i przyniosły wiele danych.

Ustalono w tych badaniach relacje filogenetyczne określone na podstawie sekwencji znalezionych w rdzeniu genomu sugerując, że szczepy SDSE wyizolowane od ludzi stanowią odrębny klaster od tych, jakie tworzą szczepy SDSE izolowane od zwierząt, ale też pochodzące od zwierząt i od ludzi szczepy SDS. Sugerowałyby to wskazywaną także w tej rozprawie doktorskiej obserwację, że szczepy gatunku *S. dysgalactiae* nie dzielą się dokładnie według ustalonych metodami genetycznymi podgatunków. Z kolei analiza sekwencji genomowych badanych szczepów zdaniem Alves-Barroco i wsp. pokazała, że niektóre z genów były unikalne dla określonych grup (Alves-Barroco, Brito, et al., 2022).

Wśród poszukiwanych w badaniach własnych tej pracy genów były geny kodujące adhezyny oddziałujące z macierzą komórek zwierzęcych i ludzkich. To bardzo duża grupa genów występujących u różnych gatunków i szczepów. Są wśród nich białka wiążące lamininę (*lmb*), fibronektynę (*fbp*), domniemane białka wiążące kolagen (*cbp*) jak i enzymy, np. dehydrogenaza 3-fosforanu gliceraldehydu (gen *gapC*), pośredniczące w przyłączaniu komórek bakterii do komórek ludzkich. Wyniki własne potwierdziły wcześniejsze obserwacje, że obecność genów *cbp* czy *fbp* jest zmienna wśród bakterii SDSE i występuje u mniejszości szczepów (Lo & Cheng, 2015; Lothar et al., 2017) a białka wiążące się z lamininą występują częściej w szczepach od ludzi (Rato et al., 2011). Alves-Barroco i wsp. (Alves-Barroco, Brito, et al., 2022) poszukiwały znacznej liczby genów w zsekwencjonowanych przez siebie genomach, co pozwoliło im zauważyć, że gen adhezyny *sdrE-2* występował tylko wśród izolatów SDSE pochodzących od zwierząt innych niż bydło – nie było go też w genomach szczepów izolowanych od ludzi. To ciekawa obserwacja, ale własne badania dotyczące adhezyn pokazały, że takie dane są bardzo cząstkowe i trudno na nich opierać bardziej uogólniające wnioski. We własnych badaniach zauważono bowiem na przykład, że gen adhezyny *prtF2* występował tylko w genomach *S. uberis*, a *prtF1* w większości badanych szczepów od ludzi. Wśród tych od zwierząt obecny był tylko u tych, które jednocześnie gromadziły inne geny lub cechy charakterystyczne dla szczepów od ludzi (Tabela 19, Wyniki, rozdz. 5.1.5). Wytwarzanie białka F1 - produktu genu *prtF1* łączy się z występowaniem zakażeń inwazyjnych ze względu na promowanie wnikania bakterii a *prtF2* z występowaniem infekcji skóry (Lizano et al., 2007; Ma et al., 2002; Ogawa et al., 2011). Pozwalałoby to uznać, że szczepy posiadające gen *prtF1* (jak np. opisany w tej pracy zwierzęcy SDS 350) dysponują większym potencjałem, dodatkowym czynnikiem chorobotwórczości, stanowiącym element ich przekształcania się w patogen stanowiący istotne zagrożenie dla ludzi.

W przypadku analiz całych sekwencji genomów badanych przez nie szczepów Alves-Barroco i wsp. (Alves-Barroco, Brito, et al., 2022) podkreślały, że szczepy *S. dysgalactiae* infekujące bydło mają więcej genów związanych z metabolizmem

węglowodanowym, kwasami tłuszczowymi, lipidami i izoprenoidami oraz oddychaniem, niż szczepy zakażające ludzi i te badane przez nie szczepy, które infekują ryby. Według tych badań kluczowy w odróżnianiu szczepów izolowanych od bydła SDSD od pozostałych jest obecny tylko u nich operon fruktozowy i sorbitolowy (Alves-Barroco et al., 2019). Genezą tych badań była praca Richards i wsp. badająca te cechy u *S. agalactiae*, gatunku stosunkowo niedawno uznanego za patogen człowieka (Richards et al., 2011). Wyprowadzono z niej wniosek, że metabolizm węglowodanowy może być związany z adaptacją do różnych nisz np. w bydłym żywcu i być specyficznym biomarkerem bydła jako gospodarza. W badaniach własnych nie poszukiwano genów tych operonów u badanych szczepów, ale dla części z nich wykonano prostą i niekosztowną analizę zdolności glikolitycznych względem czterech cukrów: glukozy, laktozy, fruktozy i sorbitolu. Choć badane zwierzęce szczepy (*S. uberis*, SDSD) pochodziły od bydła, wyniki nie przyniosły jednoznacznych rezultatów. Sorbitol rzeczywiście był wykorzystywany tylko przez szczepy od bydła, ale nie wszystkie, a aktywność względem wszystkich tych węglowodanów wykazywała tylko część badanych szczepów: 5/5 *S. uberis* i 1/3 SDSD. Fruktoza była jednak rozkładana także przez 5 z 9 badanych SDSE - szczepów izolowanych od ludzi. Należy zatem przyjąć, że ta próba znalezienia specyficznych biomarkerów szczepów od zwierząt czy od ludzi nie powiodła się w pełni, ale wskazana przez zespół portugalski reguła wyraźnie jest widoczna w przypadku części szczepów.

Badane przez Alves-Barroco (Alves-Barroco, Brito, et al., 2022) szczepy od bydła miały też mniej genów, których produkty związane są z inwazyjnością i chorobotwórczością. Należy do nich peptydaza paciorkowcowa C5a, która może rozszczepiać składnik dopełniacza C5a, wiązać się z fibronektyną i przyczyniać się do inwazji komórkowej (Cheng et al., 2002). Autorki z Uniwersytetu w Lizbonie wskazywały, że gen kodujący peptydazę C5a jest wspólny dla wszystkich szczepów SDSD (pochodzących od zwierząt i ludzi), ale nieobecny we wszystkich badanych przez nich szczepach SDSE izolowanych z materiałów od ludzi. Jest to w sprzeczności z wynikami badań własnych, w których peptydazę C5a potencjalnie mogły syntetyzować prawie wszystkie (34/36) badane szczepy SDSE (izolowane od ludzi). Porównanie to komplikuje jednak fakt, że Alves-Barroco i wsp. szukali tej peptydazy w oparciu o sekwencja genu *vpr* z *S. dysgalactiae* a nie *scp* z *S. pyogenes*. Sekwencja *vpr* tylko w 40% pokrywa się z sekwencją *scp*. Trudno zatem o jednoznaczną ocenę. Badania porównawcze wielu genów i sekwencji pokazane w pracach zespołu portugalskiego, szczególnie jeśli porównać je z wynikami własnymi pokazują, że rozległość pangenomów poszczególnych gatunków, plastyczność genetyczna i zmienność powodują, że pojedyncze szczepy tego samego gatunku lub podgatunku mogą się tak bardzo różnić, że nawet na podstawie analizy ich sekwencji można wyciągać krańcowo różne wnioski. Pokazano to też w ramach własnych badań.

Powstaje pytanie, jakie cechy badać w nadziei znalezienia biomarkera przystosowania do organizmu człowieka oraz jakie stanowią o szczególnym dla niego zagrożeniu. Wśród wybranych w prezentowanych tu badaniach szczepów zwierzęcych o cechach podobnych do tych, jakie prezentuje większość przedstawionych tu szczepów od ludzi, uwagę zwraca SDSD 350 (Tabela 19, Wyniki, rozdz. 5.1.5). Szczep ten wyizolowano z przypadku zapalenia wymion. Sekwencjonowanie genu 16S rRNA pozwoliło na stwierdzenie, że szczep SDSD 350 nie ma tak bliskiego pokrewieństwa filogenetycznego do innych badanych SDSD, jakie występuje między SDSD 431, SDSD 435, SDSD 367 (Wyniki, rozdz. 5.1.1.1., Rycina 2). Dodatkowo ten szczep wykazał inne nietypowe dla tych izolowanych od bydła cechy: aktywność wobec plaminogenu ludzkiego oraz miał gen *scp* odpowiedzialny za hamowanie składowej układu dopełniacza.

W ocenie chorobotwórczości paciorkowców *S. pyogenes* ważną rolę przypisuje się tworzonym przez nie hemolizynom. Podkreśla się także ich znaczenie dla chorobotwórczości *S. dysgalactiae*. W badaniach własnych w genomach wszystkich szczepów szukano genów zaangażowanych w ich wytwarzanie: *sagA* i *slo*. Streptolizyny te uszkadzają błony różnych typów komórek gospodarza, a zwiększając cytotoksyczność komórek bakteryjnych wpływają również na hamowanie odpowiedzi neutrofilii. Skutkuje to wzrostem przeżywalności drobnoustrojów w organizmie gospodarza. Były obecne u wszystkich badanych w tej pracy gatunków. Z tych dwóch genów *sagA* jest w istocie tylko promotorem kodującym 53 aminokwasowy prekursor streptolizyny S. To hemolizyna odpowiedzialna za hemolizę krwinek obserwowaną w warunkach laboratoryjnych na podłożach z krwią owczą. Z genem *sagA* graniczy złożony z ośmiu genów (*sagB-sagI*) locus warunkujący syntezę białek pomocniczych wymaganych do prawidłowego wytwarzania i wydzielania toksyny. Wszystkie składowe operonu konieczne są do działania i ekspresji streptolizyny S. Przypuszcza się jednak, że niepełny operon może odgrywać rolę w regulacji czynników wirulencji takich jak na przykład białko M (Alves-Barroco, Brito, et al., 2022). Powszechne występowanie u badanych w tej pracy genów streptolizyn, wykazanych dzięki startowym sekwencjom pochodzącym z *S. pyogenes*, mimo, jak można domniemywać, braku ich ekspresji u większości posiadających je szczepów, pokazuje jednak powszechną horyzontalną transmisję genów od tego gatunku, co jest z pewnością motorem szybkich i znaczących zmian, które mogą prowadzić do poszerzenia grona gospodarzy gatunków paciorkowców dotąd zwierzęcych.

W badaniach własnych nie poszukiwano genów toksyn immunomodulujących, których obecność, ale nie ekspresję, wskazuje się u różnych gatunków paciorkowców (Brandt et al., 2005; Zhao et al., 2007). Poszukiwano jednak genu *dppA*, kodującego permeazę dipeptydów. Ta związana z membraną cytoplazmatyczną lipoproteina należąca do rodziny transporterów ABC, odpowiedzialna jest za pobieranie dwupeptydów. U *S. pyogenes* w czasie mnożenia się paciorkowców, uczestniczy

w dojrzewaniu natywnej toksyny SpeB. SpeB jest superantygenem - działającą wielokierunkowo proteinazą cysteinową i ważnym czynnikiem chorobotwórczości oddziałującym na czynniki kontrolujące procesy zapalne. Obecność genu *dppA* można zatem oceniać jako możliwość ekspresji tej toksyny. W badaniach własnych znaleziono gen *dppA* u prawie wszystkich szczepów izolowanych od ludzi SDSE, ale także niektórych szczepów zwierzęcych: dwóch *S. uberis* (SU 351, SU 395) i SDSD 367. Wszystkie one dysponują cechami, które wśród tu badanych sugerują ich większy potencjał dla przekształcenia w patogen stanowiący istotne zagrożenie dla ludzi (Tabela 19, Wyniki, rozdz. 5.1.5). W regulację systemów odpowiedzialnych za ekspresję wielu znanych czynników chorobotwórczości paciorkowców zaangażowany jest też produkt genu *isp1* będący elementem dwuskładnikowego systemu przenoszenia sygnału – Mga. Gen ten jest wysoce konserwatywny wśród szczepów *S. pyogenes* (Jahagirdar et al., 2022) i ma istotne znaczenie w regulacji ekspresji szeregu genów odpowiedzialnych za zjadliwość paciorkowców, w tym białka M (McIver et al., 1996). W warunkach doświadczalnych wykazano także jego znaczenie dla rozwoju martwiczego zapalenia powięzi (Jahagirdar et al., 2022). Badania skupione na poszukiwaniach przeciwciał przeciwko białkowemu produktowi tego genu pozwoliły McIver i wsp. uważać, że białko Isp jest też produkowane w przebiegu zakażeń innymi paciorkowcami niż *S. pyogenes* (McIver et al., 1996). W badaniach własnych znaleziono gen *isp1* u większości izolowanych od ludzi SDSE, ale także u kilkunastu szczepów zwierzęcych wykazujących także inne cechy, nietypowe dla szczepów swojego pochodzenia (Tabela 19, Wyniki, rozdz. 5.1.5).

6.3. *S. gallolyticus* – nowy patogen człowieka

Zaliczany do grupy D wg Lancefield, do kompleksu SBSEC gatunek *S. gallolyticus* wywodzący się i filogenetycznie spokrewniony z gatunkiem *S. bovis* wydawał się dobrym wyborem do puli gatunków, nad którymi podjęto badania w tej pracy doktorskiej. *S. bovis* a później i inni przedstawiciele tzw. grupy *S. bovis/equinus* byli izolowani od bydła, jak i z produktów mleczarskich. Jednocześnie *S. gallolyticus* jest od pewnego czasu coraz częściej izolowany z materiałów klinicznych od ludzi. Jednak jak pokazały badania własne jego szczepy bardzo różnią się od także izolowanych od ludzi szczepów SDSE. Większość dostępnych publikacji opisuje zwykle pojedyncze przypadki zakażeń ludzi przez *S. gallolyticus*, ale ich charakter jest inny niż tych wywoływanych przez *S. dysgalactiae* (Chen et al., 2021; Jans et al., 2015; Li et al., 2019; Matesanz et al., 2015). Najwcześniej raportowano przypadki zapalenia mięśnia sercowego, jednak później coraz częściej pojawiały się doniesienia o udziale przede wszystkim podgatunku *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* w rozwoju raka okrężnicy (Butt et al., 2018; Lin et al., 2019). Natomiast SGSP opisywany jest także jako czynnik etiologiczny zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych. Są to mało zbadane paciorkowce. Opublikowane prace pokazują przypadki kliniczne ukazujące związki kolonizacji tym gatunkiem z nowotworami przewodu pokarmowego.

Podkreśla się też trudności w dobrej identyfikacji ich podgatunków, która jednoznaczna jest tylko przy zastosowaniu metody genetycznej (Ma et al., 2023). W badaniach własnych poszukiwano tych samych cech i genów związanych z chorobotwórczością jak u pozostałych gatunków badanych w rozprawie. Szczepy pochodziły z różnych materiałów klinicznych: z wymazów z ran (dwa szczepy), moczu (cztery szczepy), kału (trzy szczepy), ale też z krwi (dwa szczepy). Jedyne badane tu szczep, który genetycznie zidentyfikowany został jako SGSG wyizolowano z krwi. Jak wskazują dane zawarte w Tabeli 24, dotąd nie wykrywano u *S. gallolyticus* genów będących przedmiotem badań tej pracy. Pojedyncze prace mówią o czynnikach ich chorobotwórczości. Udowodniono na przykład, że szczepy zjadliwe *S. gallolyticus* charakteryzują się tworzeniem grubszej otoczki hialuronowej niż szczepy niezjadliwe tego gatunku (Jans & Boleij, 2018). W 2022 roku polski zespół określił strukturę egzopolisacharydu sprzyjającego tworzeniu biofilmu (Maciejewska et al., 2022). Tę zdolność wykryto też u części szczepów w badaniach własnych. Już podczas określania możliwości metabolicznych szczepy pokazały swój bliski związek z gospodarzem zwierzęcym. Tak jak inne badane w tej pracy szczepy izolowane od bydła, rozkładały kazeinę i miały szeroki profil aktywności względem węglowodanów, chociaż nie rozkładały sorbitolu. Zwraca uwagę, że szczepy *S. gallolyticus* nie miały często występujących u badanych w tej pracy innych gatunków genów warunkujących adhezję. Część szczepów miała gen streptokinazy, a wszystkie trzy badane wykazywały jej ekspresję. Jednak ekspresja ta przedstawiała się inaczej niż u szczepów SDSE izolowanych od ludzi, tj. aktywacja ludzkiego plazminogenu była na niskim poziomie, ale aktywacja bydlęcego na poziomie podobnym jak SDSE. Badania własne przyniosły jako pierwsze, dotąd niepublikowane, dane o częstym występowaniu w ich genomach oraz ekspresji genu *scp* peptydazy paciorkowcowej C5a, która może rozszczepiać składnik dopełniacza C5a, wiązać się z fibronektyną i przyczyniać się do inwazji komórkowej. Wskazały także na częste występowanie genu *ispI*, który ma istotne znaczenie w regulacji ekspresji szeregu genów odpowiedzialnych za zjadliwość paciorkowców w tym ma też wpływ na tworzenie biofilmu. Dwa szczepy miały też istotny dla regulacji SpeB, proteiny cysteinowej, gen *dpp*. Być może są to te cechy, które pomogły temu gatunkowi osiągnąć zdolność zakażenia człowieka, potwierdzając wnioski z przedstawionych wyżej badań innych gatunków. Otrzymane wyniki zachęcają do dalszych, znacznie szerszych, badań nad chorobotwórczością *S. gallolyticus*.

6.4. *Staphylococcus pseudintermedius* – patogen zwierząt i ludzi

Badania tej pracy pokazują, że różnice między szczepami tych gronkowców izolowanymi od ludzi i od zwierząt są niewielkie i potwierdzają, że *Staphylococcus pseudintermedius* stał się już ludzkim patogenem. Phumthanakorn i wsp. wskazywali na zdolność tego gatunku bakterii do kolonizacji organizmu człowieka (Phumthanakorn et al., 2017). Dokładne określenie poziomu na drabinie Wolfe (Wolfe

et al., 2007) wymagałoby jednak danych dotyczących transmisji pojedynczych szczepów między zwierzętami a ludźmi i wykazanie czy przenoszą się też bezpośrednio między ludźmi oraz jak długi jest taki łańcuch przenoszenia.

Staphylococcus pseudintermedius nie jest odosobniony, bo wśród gronkowców jest szereg gatunków, które lokują się na różnych poziomach zaproponowanej drabiny ewolucyjnej. W ciągu ostatnich lat pojawiło się kilka przypadków zakażeń nowymi patogenami tego rodzaju u człowieka. Pojedyncze przypadki infekcji spowodowane przez *S. delphini* czy *S. cornubiensis* zostały opisane dopiero niedawno (Magleby et al., 2019; Murray et al., 2018; Peer et al., 2011).

Zwraca się uwagę, że szczepy gronkowców, w tym te metycylinooporne, są przenoszone na człowieka najczęściej od zwierząt domowych (Khairullah et al., 2023; Moses et al., 2023). Nawet 90% zdrowych psów może być skolonizowanych przez *S. pseudintermedius*, stanowiąc komensale skóry i błon śluzowych. Gronkowce te są również odpowiedzialne za pojawiające się infekcje skóry, piodermie (Moses et al., 2023). W przypadku kotów obecność tego gatunku występuje rzadziej, gdyż ich skóra różni się podatnością na czynniki adhezyjne tego gatunku. W przenoszeniu bakterii podkreśla się rolę bliskości ekologicznej zwierząt towarzyszących i człowieka (Abdullahi et al., 2022; Moses et al., 2023; Woolhouse & Gaunt, 2007). *S. pseudintermedius* mogą być jednak przenoszone również ze zwierząt dzikich (Abdullahi et al., 2022). U ludzi zakażenie rozwijające się w wyniku przeniesienia *S. pseudintermedius* ze zwierzęcia może manifestować się nie tylko infekcją skóry i tkanek miękkich, ale także rozwojem infekcji inwazyjnej - zapaleniem stawu, płuc czy bakteriecią i sepsą (Moses et al., 2023).

Podobnie jak w przypadku paciorkowców, wiele infekcji powodowanych przez gronkowce typowo zwierzęce u człowieka pozostaje niezdiagnozowanych a częstość infekcji może być niedoszacowana. Błędy w identyfikacji tego gatunku wynikają z jego podobieństwa do dobrze poznanego jako patogen ludzki *S. aureus* (Moses et al., 2023; Pena et al., 2016). W identyfikacji gronkowców szeroko wykorzystywane są metody zautomatyzowane, w tym testy paskowe i MALDI TOF MS, ale bazy danych zawierają mniejszą reprezentację gatunków rzadko występujących u człowieka, stąd wyniki są mniej wiarygodne. W przypadku identyfikacji gronkowców koagulazododatnich zalecane jest zastąpienie metod klasycznych metodami molekularnymi. Jedną z najskuteczniejszych jest przeprowadzenie reakcji PCR z wykorzystaniem genu termonukleazy, *nuc*. Gen ten różnicuje szczepy *S. pseudintermedius* od *S. aureus* i innych SIG (Moses et al., 2023).

Analiza i badania porównawcze szczepów *S. pseudintermedius* korzystają z oznaczeń przynależności ich typów sekwencji ST. Pozwala to na śledzenie rozprzestrzeniania się a także określanie związków filogenetycznych między szczepami. Typowanie sekwencji DNA genów podstawowych umożliwia ocenę zróżnicowania populacji bakterii oraz śledzenie powiązań epidemiologicznych.

Większość opisywanych w literaturze danych dotyczy sekwencjonowania i analiz MLST metycylinoopornych szczepów *S. pseudintermedius* (ang. *methicillin-resistant Staphylococcus pseudintermedius*, MRSP), będących przyczyną infekcji. Nie pokazano takiej zależności w przypadku szczepów wrażliwych na metycylinę i takich, które są komensalami zwierząt (Morais et al., 2023). Przedstawione w tej pracy wyniki to potwierdzają. Szczepy wrażliwe na β -laktamy wykazały duże zróżnicowanie. Szczepy metycylinooporne charakteryzowały się klonalnością w obrębie jednego z najczęściej występujących ST, ST71. Wyniki te podkreślają także, że pangenom szczepów *S. pseudintermedius* zawiera więcej genów. Dodatkowo szczepy te są bardziej zróżnicowane i heterogeniczne (Fabregas et al.).

Szczepy *S. pseudintermedius* stanowią poważne zagrożenie dla zdrowia człowieka, wyposażone są bowiem w szereg czynników wirulencji obecnych także u *S. aureus*. Wpływają one na proces kolonizacji jak i na inwazyjność. Wyniki własne pokazują znaczny potencjał adaptacyjny szczepów badanych bez względu na ich pochodzenie. Charakteryzowały się one dobrym wyposażeniem w geny kodujące czynniki przylegania do macierzy zewnątrzkomórkowej gospodarza. Zarówno u szczepów izolowanych z materiałów od zwierząt jak i od ludzi występowały geny białek powierzchniowych. Wiadomo, że *S. pseudintermedius* charakteryzują się lepszymi właściwościami przylegania niż *S. aureus*, m.in. do fibronektyny (Moses et al., 2023). Białka powierzchniowe Sps ułatwiają przyleganie bakterii ponadto do fibrynogenu i cytokeratyny. Istotną rolę w procesie adhezji odgrywiają białka SpsP i SpsQ, których geny obecne były jednak tylko w badanych szczepach pochodzących od zwierząt. Trudno wytłumaczyć ten fakt, być może w zakażeniach ludzi mają one mniejsze znaczenie. Często spotykane są w szczepach izolowanych z infekcji u psów (Phumthanakorn et al., 2017). Białka SpsP i SpsQ są bowiem homologiczne do białka A występującego u *S. aureus*. Pełni ono funkcję wiązania IgG oraz hamuje działanie układu dopełniacza gospodarza (Gonzalez-Martin et al., 2020). Z kolei białka SpsL i SpsO znane ze swej roli w inwazji psich keratynocytów (Gonzalez-Martin et al., 2020), obecne były wśród badanych w tej pracy *S. pseudintermedius*, z czego gen kodujący białko SpsO przede wszystkim u szczepów od ludzi.

Wśród genów kodujących cechy adhezyjne powszechnie, u obu grup badanych tu szczepów, występował gen kodujący enolazę, stanowiącą receptor dla plazminogenu oraz warunkującą przyleganie do lamininy budującej błonę podstawną naczyń (Zuniga et al., 2015). Proces kolonizacji związany jest również z tworzeniem biofilmu. Zdolność do tworzenia tej struktury jest powszechna wśród gronkowców. Potwierdziła to również obecność w genomach badanych w przedstawianej pracy genów operonu *icaADCB*. Operon ten stymuluje produkcję polisacharydowej cząsteczki adhezji międzykomórkowej, PIA, głównej składowej biofilmu (Casagrande Proietti et al., 2015; Meroni et al., 2019). Penetracja tkanek przez bakterie związana jest również z ich aktywnością enzymatyczną. Badane szczepy wytwarzały licznie

lipazy oraz proteazy. Szczepy izolowane od zwierząt charakteryzowały się również zdolnością do produkcji żelatynazy, więc mogą mieć możliwości rozkładu tkanek nowego gospodarza. Wymienione enzymy wpływają również na rozkład łożu, warstwy ochronnej skóry, co ma wpływ na ekspansję bakterii w miejscu infekcji (Kmieciak & Szewczyk, 2018).

Chorobotwórczość *S. pseudintermedius* najczęściej wiązana jest z miejscowymi infekcjami skóry, mają one szereg cech, umożliwiających osiedlenie i mnożenie na powierzchni ciała. Jednak badane w ramach tej pracy *S. pseudintermedius* wykazały ponadto potencjalną zdolność wytwarzania toksyn, a wśród nich toksyn epidermolitycznych. Wszystkie badane szczepy miały w swoich genomach geny *siet*, toksyny złuszczającej. Podkreśla się jej rolę w rozwoju piodermii czy przewlekłym zapaleniu ucha. Dodatkowo u niektórych, trzech „ludzkich” *S. pseudintermedius* i jednego wyizolowanego od zwierzęcia były obecne geny *exiA* i *exiB*, których produkty odgrywają rolę w czasie śródskórnego rozszerzenia naskórka poprzez degradację desmogleiny (Gonzalez-Martin et al., 2020).

Inwazyjność w przypadku *S. pseudintermedius* wiązana jest również z obecnością leukotoksyn i hemolizyn uszkadzających błony komórkowe gospodarza, których geny obecne były u wszystkich badanych *S. pseudintermedius*. Leukotoksyny obecne u tego gatunku wykazują analogię do występującej u *S. aureus* leukocydyny (Panton-Valentine). Wykazano wyraźny związek między szczepami mającymi gen *pvl* a patogenezą chorób, które manifestują się zmianami nekrotycznymi, tj. martwicze zapalenie płuc, martwicze zapalenie powięzi, zapalenie szpiku czy infekcje skóry (Chrobak-Chmiel et al., 2018; Hoppe et al., 2019; Loffler et al., 2010), co pokazuje szczególne zagrożenie w przypadku zakażeń szczepami tego gatunku.

Ważną rolę nie tylko w procesie identyfikacji, ale także rozwoju infekcji u szczepów *S. pseudintermedius* odgrywa wolna koagulaza obecna u wszystkich badanych szczepów niezależnie od tego czy izolowano je od ludzi czy od zwierząt. Stanowi ona ważny czynnik zapewniający bakteriom ochronę przed rozpoznaniem przez układ immunologiczny gospodarza (Sewid et al., 2018). W przypadku szczepów *S. aureus* obok koagulazy wolnej powszechna jest obecność na powierzchni komórek koagulazy związanej tzw. Clumping Factor (Zapotoczna et al., 2015). Ta cecha także i w badaniach własnych różnicuje szczepy pochodzące od ludzi, posiadające (choć nie wszystkie) CF w odróżnieniu od izolowanych od zwierząt, które go nie mają. Dowiedziono, że CF odgrywa rolę w rozwoju nie tylko zakażeń skóry, ale również zakażeń inwazyjnych takich jak zapalenie wsierdzia czy stawów (Lacey et al., 2016; Lacey et al., 2019).

6.5. Zakażenia człowieka pochodzącymi od zwierząt szczepami paciorkowców i gronkowców - wyzwanie terapeutyczne

W leczeniu zakażeń spowodowanych przez paciorkowce terapię pierwszego rzutu stanowią penicyliny. Ta grupa antybiotyków ciągle zachowuje pełną skuteczność w stosunku do *S. pyogenes*. Niepokój budzi jednak fakt, że w rodzaju *Streptococcus* ta skuteczność nie jest powszechna względem wszystkich gatunków. W ostatnich latach obserwuje się wzrost oporności na tę grupę terapeutyczną wśród szczepów *S. pneumoniae* i *S. agalactiae*. Obniżona wrażliwość wystąpiła również u szczepów *S. uberis* i *S. suis*, które stanowią patogeny zwierząt, ale są również odpowiedzialne za pojawiające się z różną częstotliwością infekcje ludzi (Hakenbeck et al., 2012; McDougall et al., 2014). W przypadku paciorkowców, podobnie jak u gronkowców, oporność na penicyliny związana jest z modyfikacjami białek wiążących penicyliny zmniejszającymi powinowactwo do antybiotyku. U paciorkowców jest ona kodowana przez geny *pbp2b*, *pbp2x*, rzadziej przez *pbp1a* (Bicmen et al., 2006; Haenni & Moreillon, 2006). Wśród badanych w tej pracy szczepów paciorkowców *S. uberis* i *S. dysgalactiae* pochodzących z infekcji ludzi i zwierząt nie było szczepów opornych, ani tych o obniżonej wrażliwości na penicyliny. Nie wykryto także genu *pbp2b*. W obrębie grupy SBSEC, z której wywodzi się *S. gallolyticus* do niedawna w pełni wrażliwych na penicyliny w 2012 roku znaleziono szczepy obniżonej wrażliwości na penicylinę (Klatte et al., 2012). W przypadku szczepów badanej w tej pracy kolekcji pochodzących z infekcji u ludzi oporności nie stwierdzono również wobec cefalosporyn. Zatem we wszystkich przypadkach zastosowanie penicylin w przypadku zakażeń nieinwazyjnych jak i inwazyjnych byłoby możliwe i uzasadnione. Konieczne jest jednak niekiedy stosowanie leczenia uzupełniającego lub alternatywnego, do którego wykorzystuje się makrolidy i linkozamidy. Jak wynika z raportów, takie leczenie może powodować niepowodzenie i nawroty, gdyż narasta wśród paciorkowców oporność na tę grupę antybiotyków (Misic et al., 2018; Villalon et al., 2023).

Mechanizmy oporności na grupę makrolidów, linkozamidów i streptograminy B wykryte zostały w tych badaniach wśród szczepów izolowanych z materiałów od ludzi: *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* oraz *S. gallolyticus*. Był to zarówno mechanizm oporności konstytutywny jak i indukcyjny. Wśród paciorkowców niepokojący wzrost oporności na makrolidy związany może być z nadużywaniem tej grupy terapeutycznej do prewencji rozwoju bakteryjnego zapalenia płuc w czasie trwania pandemii COVID-19. Występowanie genów oporności klasy *erm* kodujących oporność na makrolidy, linkozamidy i streptograminy B wśród badanych szczepów było częstsze w grupie tych izolowanych z infekcji u ludzi. Co ciekawe, tylko w tej grupie wystąpiły geny *ermA* i *ermTR*, obecne w tandemie. Niepokojący jest również wzrost oporności paciorkowców na linkozamidy. Gwałtowne narastanie oporności na tę grupę cennych względem ziarenkowców gramdodatnich antybiotyków obserwuje się od 2010 roku (Cortes-Penfield & Ryder, 2023; Faye et al., 2014). Klindamycyna

stanowi ważną część terapii w przypadku wystąpienia inwazyjnych zakażeń paciorkowcowych takich jak martwicze zapalenie powięzi oraz paciorkowcowy zespół wstrząsu toksycznego (ang. *streptococcal toxic shock syndrome*, STSS). Stosowana w połączeniu z antybiotykiem β -laktamowym ma za zadanie zmniejszać wytwarzanie superantygenów dzięki silnemu efektowi supresyjnemu syntezy białek, w tym tych odpowiedzialnych za zjadliwość szczepów (Berbel et al., 2022; Burnham & Kollef, 2018; Plainvert et al., 2015). Wytwarzanie toksyn immunomodulujących jest domeną nie tylko szczepów *S. pyogenes*, ale także *S. dysgalactiae* czy *S. equi*. W badaniach własnych nie były one poszukiwane, ale wykazano, choćby na przykładzie hemolizyn, że w rodzaju *Streptococcus* powszechne jest horyzontalne rozprzestrzenianie się genów toksyczności (Schmitz et al., 2018). U szczepów badanych izolowanych od zwierząt mechanizm oporności MLS_B występował tylko u pojedynczych szczepów, niepokojącym jest powszechne występowanie w tej grupie genu oporności na linkozamidy *lnuD*, kodującego nukleotydylotransferazę katalizującą zmiany struktury antybiotyku (Kaczorek et al., 2017). Możliwa oporność na linkozamidy dotyczy więc nie tylko szczepów izolowanych z infekcji u ludzi. Tymczasem obok blokowania toksyny klindamycyna hamuje także syntezę białka M i w ten sposób ułatwia fagocytozę, ma też wpływ na hamowanie syntezy białek PBP, więc stanowi ważną pozycję w terapii zakażeń.

W leczeniu zakażeń paciorkowcami stosuje się też fluorochinolony. Chociaż nie stwierdzono fenotypowej oporności na fluorochinolony wśród obu grup badanych szczepów, u blisko 50% obecne były geny kodujące oporność na tę grupę antybiotyków. W zakażeniach paciorkowcowych wskazuje się na rosnącą oporność wobec tej grupy terapeutycznej stosowanej najczęściej w połączeniu z antybiotykami β -laktamowymi (Leitner et al., 2015). Badane w ramach tej pracy doktorskiej *S. dysgalactiae* miały też często geny oporności na aminoglikozydy. Wskazywać to może na potencjalną nieskuteczność zamierzonego synergizmu w trakcie leczenia skojarzonego z antybiotykami β -laktamowymi (Torres et al., 2022). Ogromnie niepokojąca była powszechna oporność wśród badanych szczepów wobec tetracyklin, geny oporności na tę grupę antybiotyków miało blisko 100% badanych. Należy się spodziewać, że zwierzęce szczepy zyskujące możliwość zakażenia człowieka będą wykazywały taką oporność. Przyczyny należy upatrywać w szerokim stosowaniu tetracyklin w weterynarii (Haenni et al., 2018). Obecnie ta grupa terapeutyczna, ze względu na wysoki stopień oporności, jest rzadko stosowana w leczeniu zakażeń paciorkowcowych.

Także badane szczepy gronkowców - *S. pseudintermedius* były odporne na wiele grup antybiotyków. Dwa z nich były metycylinooporne, co pociąga za sobą oporność na wszystkie antybiotyki β -laktamowe. Pierwszy szczep metycylinooporny *S. pseudintermedius* odnotowano w 2007 roku i od tego czasu częstość występowania tego rodzaju oporności stale wzrasta nie tylko w medycynie weterynaryjnej, ale wśród

szczepów izolowanych od ludzi. Obserwuje się oporność szczepów metycylinoopornych *S. pseudintermedius* nie tylko na antybiotyki β -laktamowe, ale także inne leki przeciwdrobnoustrojowe: makrolidy, linkozamidy, aminoglikozydy czy trimetoprim. To także cechy szczepów badanych w ramach tej pracy.

Oporność wobec fluorochinolonów jak i sulfametoksazolu z trimetoprimem wystąpiła tylko u tych szczepów badanych, które były odpowiedzialne za zakażenia zwierząt. W badaniach Moses i wsp. (Moses et al., 2023) oraz Silva i wsp. (Silva et al., 2021) pokazano, że metycylinooporne szczepy *S. pseudintermedius* należą przede wszystkim do kilku typów klonalnych, między innymi ST71, ST45 czy ST181. Typ ST71 jest powszechny w Europie, należały do niego również dwa szczepy badane w tej pracy. Wskazuje się na rozprzestrzenienie w ostatnich latach klonów metycylinoopornych. Przynależność do typów klonalnych pozwala śledzić także ich przenoszenie między zwierzętami a ludźmi. Może zatem być bardzo pomocne w ocenie stopnia przemiany ewolucyjnej gatunków pierwotnie zwierzęcych. Było to obserwowane w przypadku zarówno *S. aureus* jak i w zakażeniach *S. pseudintermedius*, gdy te same klony znajdowano u zwierząt towarzyszących i ich właścicieli (Khairullah et al., 2023; Moses et al., 2023). W ramach tej pracy wykryto wiele typów sekwencyjnych, ale tylko dwie pary szczepów należące do tych samych typów, mimo że badane były szczepy izolowane geograficznie na małym terenie. Ważną obserwacją jest, że należące do tego samego klonu ST71 szczepy metycylinooporne, co obserwowano także w tej pracy w przypadku izolowanych od zwierząt SPZ 4 i SPZ 7, wyposażone są w znaczącą liczbę czynników chorobotwórczości, charakteryzując się dobrymi zdolnościami adhezyjnymi. Moses i wsp. (Moses et al., 2023) wykazali w swoich badaniach, że mają one też zdolność przylegania do ludzkich korneocytów. W ostatnich latach dochodzi do zmiany struktury populacji szczepów metycylinoopornych tego gatunku. Charakteryzuje ją obecnie większa różnorodność. Wcześniej dominujący w Europie typ sekwencyjny ST71 ustępuje pierwszego miejsca typom ST258 i ST496. Jednocześnie obserwuje się większy zasięg geograficzny typu europejskiego, przenikający do Azji czy Ameryki Północnej i Południowej. Zmiana ta może mieć związek z dalszym rozwojem mobilności społeczeństwa i transportu zwierząt w różnych lokalizacjach geograficznych (Srednik et al., 2023).

Do obecnej chwili wśród *S. pseudintermedius* nie odnotowano jeszcze oporności na wankomycynę, daptomycynę czy linezolid (Moses et al., 2023). Ze względu jednak na powszechny wśród gronkowców horyzontalny transfer genów, występowanie heterooporności i pojawianie się opornych na glikopeptydy szczepów *S. aureus* i gronkowców koagulazoujemnych sytuacja ta może ulec zmianie (Szemraj et al., 2023). W ostatnich latach opisano na przykład szczep zwierzęcego gatunku *S. kloosii* oporny na linezolid wyizolowany z krwi człowieka (Peer et al., 2011).

Uzyskane w badaniach własnych wyniki wskazują na zagrożenie ze strony metycylinoopornych gronkowców *S. pseudintermedius* izolowanych od zwierząt, które mają w swoich genomach wiele czynników odpowiadających za adhezję i inwazyjność, korzystnie wpływających na adaptację do nowego gospodarza. Należy też brać pod uwagę, że nowe, pochodzące od zwierząt patogeny człowieka już od początku poszerzania zakresu swoich gospodarzy, będą poważnym wyzwaniem terapeutycznym, ze względu na przyniesioną w genomach wielolekooporność.

7. Podsumowanie wyników

1. Z przypadków zapalenia wymion u krów wyizolowano do badań 25 szczepów *S. uberis*, dwa szczepy *S. parauberis*, pięć szczepów *S. dysgalactiae*. Identyfikacja tych i pozostałych badanych szczepów należących do gatunku *S. gallolyticus* wymagała zastosowania metod genetycznych.

2. Ocena zdolności metabolicznych badanych gatunków paciorkowców pokazała ich zdolności sprzyjające kolonizacji tkanek. Wśród badanych szczepów paciorkowców izolowanych z materiałów klinicznych od ludzi rzadziej wykrywano kazeinazę, która była enzymem charakterystycznym dla szczepów izolowanych od zwierząt. Nieobecny był u nich natomiast gen *hylB* kodujący liazę hialuronianową. Wyniki badań wskazały ponadto na zmniejszone spektrum aktywności glikolitycznej u szczepów izolowanych z materiałów klinicznych od ludzi i zdolność tylko szczepów izolowanych od bydła do rozkładu sorbitolu.

3. Odpowiedzialne za kolonizację badanych paciorkowców geny związane ze zdolnością do adhezji wystąpiły najliczniej wśród szczepów *S. dysgalactiae*, przy czym między dwoma podgatunkami zaobserwowano różnice pozwalające na uznanie niektórych z nich za szczególnie korzystne dla szczepów lepiej przystosowanych do infekowania ludzi. Były to geny *lmb*, *prtF1* i *isp1*.

Kolonizację przez badane ludzkie i zwierzęce gronkowce *Staphylococcus pseudintermedius* umożliwiają licznie wykryte geny odpowiedzialne za wiązanie macierzy zewnątrzkomórkowej gospodarza, ale tylko szczepy izolowane od zwierząt miały geny *spsP* i *spsQ*.

4. Ocena inwazyjności szczepów obejmowała szereg cech. Gen wskazujący na potencjalną zdolność syntezy streptokinazy był obecny u wszystkich *S. dysgalactiae* i licznych szczepów pozostałych gatunków, jednak nie u wszystkich badanych poszukiwany gen ulegał ekspresji. Zróznicowany też był poziom aktywacji plazminogenu ludzkiego i bydlęcego pokazując, że ta cecha powinna być rozpatrywana w ocenie potencjalnej adaptacji do człowieka jako nowego gospodarza.

Zdolność wyrastania w obecności surowicy ludzkiej i bydlęcej okazała się cechą bardzo różnicującą szczepy, ale nie gatunki. Wyrastanie w surowicy ludzkiej, z różną częstością, było cechą szczepów trzech z badanych gatunków: *S. uberis*, *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* i *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis*.

Geny ważnych hemolizyn: streptolizyny O i S wykryto z różną częstością u szczepów wszystkich badanych gatunków. Gen streptolizyny O wykrywano częściej u szczepów izolowanych od zwierząt.

Tylko w genomach „ludzkich” szczepów SDSE znaleziono gen paciorkowcowego inhibitora dopełniacza *sicG*, ale gen DNazy - *sdn* tylko u szczepów gatunków izolowanych od zwierząt.

Wśród wszystkich szczepów *S. pseudintermedius*, zarówno w grupie szczepów izolowanych od zwierząt jak i od ludzi, powszechne były geny leukotoksyn i eksfoliatyn. Tylko szczepy izolowane od ludzi miały związany z powierzchnią komórki czynnik CF.

5. *S. gallolyticus* wśród badanych paciorkowców pod wieloma względami odbiegał w swej charakterystyce od pozostałych badanych gatunków. Przy zbliżonych do szczepów izolowanych od zwierząt cechach metabolicznych (zdolność rozkładu kazeinazy i szeroki profil rozkładu cukrów), miał występujące powszechnie w szczepach SDSE geny *isp1* i *dppA*.

6. Ocena lekowrażliwości badanych gatunków *Streptococcus* wskazała na ich wrażliwość wobec wielu antybiotyków, ale wykazano oporność dla makrolidów i linkozamidów oraz tetracyklin. Wśród szczepów *S. pseudintermedius* wiele było wielolekoopornych.

8. Wnioski z przeprowadzonych badań

Badania opisane w niniejszej pracy były z założenia wielokierunkowe. Zebrane i przedstawione wyniki nie uprawniają do formułowania uogólnień a jedynie wskazują kierunki dalszych potrzebnych badań.

1. Dla gatunków obu rodzajów, względem których jest uzasadnione podejrzenie, że mogą stanowić zagrożenie jako nowe patogeny człowieka, trzeba opracować sondy dla ich genetycznej identyfikacji, bowiem fenotypowe metody mogą być zawodne, a ich zaklasyfikowanie może mieć istotne znaczenie dla przewidywania kierunku przemian i stopnia zagrożenia w zakażeniach ludzi.

2. Wśród szczepów każdego z badanych gatunków i rodzajów obserwowano dużą zmienność w obrębie poszukiwanych i określanych cech chorobotwórczości i lekowrażliwości. Różnorodność wyników w wykonywanych testach i oznaczeniach popiera tezę o ich bardzo szerokim pangenomie.

3. Analizując wyniki otrzymane dla badanych szczepów paciorkowców, ale także uwzględniając wyniki innych autorów, uprawniony jest wniosek, że o przełamywaniu bariery, jaką stanowi dla patogenów organizm człowieka, mniejsze znaczenie mają zdolności kolonizacyjne wyrażone w produkcji białek adhezyjnych, które są często uniwersalne w obrębie ssaków.

4. U paciorkowców za najistotniejsze dla przełamywania tej bariery należy uznać cechy pozwalające przeciwstawić się działaniom układu immunologicznego człowieka i systemy ich regulacji w komórkach bakterii. Uznając istotne znaczenie genów peptydazy C5a dopełniacza *scp* i paciorkowcowego inhibitora dopełniacza *sicG* oraz genów zaangażowanych w regulację ekspresji *dppA* i *isp1* na podstawie otrzymanych wyników żadnego z tych genów nie można jeszcze wskazać jako markera świadczącego o adaptacji do organizmu człowieka.

5. Wskazówką dla oceny adaptacji badanych szczepów i gatunków paciorkowców do organizmu człowieka może być proporcja wartości ilościowego oznaczenia aktywności streptokinazy względem plazminogenu ludzkiego i zwierzęcego. Proponowane dotychczas metody jakościowe a także ocena obecności genu *ska* są niewiarygodne.

6. Pomocnym elementem oceny dyskryminującym zdolności adaptacji do organizmu człowieka jest zdolność wyrastania w normalnej surowicy ludzkiej i bydlęcej.

7. Rozpowszechnienie genów paciorkowcowych hemolizyn wśród różnych gatunków świadczy o szerokim międzygatunkowym horyzontalnym transferze, ale nie wydaje się mieć znaczenia dla przełamywania barier, choć z pewnością ma znaczenie dla rozwoju zakażenia, jeśli do niego dojdzie.

8. Niepokojąca w perspektywie leczenia zakażeń paciorkowcami jest obecna u badanych szczepów w różnych mechanizmach oporność na linkozamidy, a w przypadku gronkowców metycylinooporność. W badaniach lekooporności obu rodzajów potrzebne jest oznaczanie poziomu oporności zgodnie z przyjętymi wytycznymi, ale w dalszej perspektywie przydatne może być badanie rozpowszechnienia genów oporności stanowiących potencjalne zagrożenie, gdyby doszło do ich ekspresji.

Wypływające z wyników tej pracy szczegółowe wnioski, przede wszystkim te dotyczące pojedynczych szczepów paciorkowców, zachęcają do podjęcia i kontynuowania badań w wielu kierunkach, które mogą znacząco poszerzyć wiedzę na temat adaptacji patogenów zwierzęcych do organizmu człowieka. Szczególne znaczenie może mieć przeprowadzenie następujących badań

1. Sekwencjonowanie genomów szczepów paciorkowców wyselekcjonowanych w Tabelach 19 i 20, poszukiwanie w nich genów badanych w tej pracy, ale i innych genów chorobotwórczości oraz ocena ich ekspresji.

2. Wykrywanie białka M i typowanie genu *emm* szczepów paciorkowców i poszukiwanie podobieństwa lub odmienności poszczególnych szczepów w celu ustalenia ewentualnego związku ze stopniem dostosowania do gospodarza.

3. Szerokie badania cech chorobotwórczości *S. gallolyticus* przeprowadzone w kontekście danych klinicznych dotyczących wyizolowanych szczepów np. tych z moczu w przebiegu cukrzycy, z krwi w bakteriemii czy potwierdzonego nosicielstwa w przewodzie pokarmowym.

Obserwowane zjawisko przełamania bariery międzygatunkowej jest długofalowe, zachodzi z różną szybkością w przypadku różnych gatunków, a na dodatek obejmuje szeroki wachlarz cech, które mogą mu towarzyszyć. Zebranie na potrzeby badań kolekcji takich szczepów jest trudne, bo częstość ich izolacji jest ciągle niewielka. Z kolei zbadanie ograniczonej liczby szczepów w oczywisty sposób nie może przynieść danych statystycznych, które zdecydowanie mogłyby odpowiedzieć na pytanie, od czego zależy skuteczność tej adaptacji. Może jednak pozwolić na obserwacje wskazujące kierunek dalszych poszukiwań i złożyć się, jako element, na szereg obserwacji publikowanych przez badaczy z różnych krajów i pozwolić wtedy na wyciągnięcie wniosków o kluczowym znaczeniu.

9. Streszczenie

W ostatnich latach bardziej zauważalne stały się nowe choroby infekcyjne człowieka, które przenoszone są od zwierząt. Tym samym baczniej obserwuje się drobnoustroje, które są ich przyczyną. Wśród bakterii „zwierzęcych” o różnym stopniu potencjału patogennego względem ludzi znajdują się przedstawiciele rodzajów *Streptococcus* i *Staphylococcus*, których cechy analizowano w przedstawionej rozprawie doktorskiej. Wybrane do badań gatunki w różnym stopniu i z różną częstością są wskazywane jako przyczyny chorób człowieka.

Podjęte badania zmierzały do oceny zdolności zaadaptowania wybranych gatunków do gospodarza, jakim jest człowiek. Poszukiwania miały także na celu ocenę stopnia zagrożenia ze strony pojawiających się nowych patogenów. Przyjęto, że na proces adaptacji patogenu zwierzęcego do człowieka mają wpływ cechy związane ze zdolnościami kolonizacyjnymi oraz zdolnością do inwazji i poszukiwano wyznaczników (markerów), mogących wpływać na to przystosowanie. Celem było także zbadanie, jakimi możliwościami terapeutycznymi może dysponować lekarz w wypadku rozwoju zakażenia człowieka tymi szczepami.

Wszystkie 93 szczepy badane w ramach tej pracy zostały zidentyfikowane genetycznie. Szczepy *Streptococcus* pochodzące z materiałów klinicznych od ludzi zostały wcześniej zidentyfikowane metodą MALDI TOF MS, a tę identyfikację potwierdzono genetycznie, wykorzystując starter sdys oparty o sekwencję 16S rRNA dla *S. dysgalactiae*, a startery tanB oraz sgp dla podgatunków *S. gallolyticus*. Gatunki rzadko izolowane od ludzi: *S. uberis*, *S. parauberis* oraz *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* wyhodowano, analizując 660 próbek mleka z przypadków zapalenia wymion u bydła i zidentyfikowano fenotypowo oraz genotypowo z wykorzystaniem starterów pauA identyfikujących *S. uberis* oraz spa2152, spa2870 pozwalających na identyfikację *S. parauberis*. W przypadku nowych w tej kolekcji szczepów *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* uzyskane w wyniku sekwencjonowania genu 16S rRNA sekwencje umieszczono w bazie GenBank. Na podstawie procentu identyczności z innymi sekwencjami zidentyfikowanymi do podgatunku ułożono te szczepy w drzewie filogenetycznym. W przypadku rodzaju *Staphylococcus* analizą objęto 14 szczepów *S. pseudintermedius* wyizolowanych zarówno z materiałów klinicznych od zwierząt jak i od ludzi. Pochodziły one z kolekcji własnej i zostały wcześniej zidentyfikowane genetycznie. W celu oceny pokrewieństwa filogenetycznego sekwencjonowano geny metabolizmu podstawowego tych szczepów i wykonano analizę MLST. Sekwencje również umieszczono w bazie GenBank.

W badaniach zastosowano metody hodowlane, badania cech metabolicznych i właściwości biologicznych, a także poszukiwano genów metodą PCR na podstawie sekwencji pochodzących z *S. pyogenes* i *S. dysgalactiae* w przypadku paciorkowców oraz z *S. aureus* i *S. pseudintermedius* w przypadku gronkowców. U wybranych szczepów z rodzaju *Streptococcus* badano ekspresję niektórych genów inwazyjnych,

streptokinazy, peptydazy C5a układu dopełniacza, paciorkowcowego inhibitora dopełniacza oraz fosfolipazy A2.

Wśród ocenianych cech metabolicznych paciorkowców obecność kazeinazy jak też szerokie zdolności sacharolityczne, w tym rozkład sorbitolu, okazały się charakterystyczne dla szczepów izolowanych od zwierząt. Wśród tej grupy szczepów rzadko występował natomiast gen kodujący liazę hialuronianową (*hylB*), charakterystyczny dla szczepów izolowanych od ludzi. Odpowiedzialne za kolonizację badanych paciorkowców geny adhezji do ECM (wspomniany wcześniej *hylB* a także *fbp*, *cbp* czy *prtF1*) wystąpiły liczniej wśród szczepów *S. dysgalactiae* niż u pozostałych gatunków paciorkowców. U szczepów *Staphylococcus pseudintermedius* wykryto geny odpowiedzialne za wiązanie ECM i kolonizację w podobnym stopniu u szczepów „ludzkich” i „zwierzęcych”, ale tylko szczepy izolowane od zwierząt miały geny *spsP* i *spsQ*.

W ocenie inwazyjności szczepów szczególną uwagę poświęcono streptokinazie. Kodujący ją gen *ska* był obecny u wszystkich *S. dysgalactiae* i licznych szczepów pozostałych gatunków, jednak nie u wszystkich badanych ulegał ekspresji. Zróznicowany też był poziom aktywacji plazminogenu ludzkiego i bydlęcego pokazując, że ta cecha może być rozpatrywana w ocenie potencjalnej adaptacji do człowieka jako nowego gospodarza. Cechą bardzo różnicującą szczepy „ludzkie” i „zwierzęce”, ale nie gatunki, okazała się zdolność wyrastania w obecności surowicy bydlęcej i ludzkiej. Tylko w genomach szczepów *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis*, izolowanych od ludzi, znaleziono gen paciorkowcowego inhibitora dopełniacza *sicG*, ale gen DNazy - *sdn* tylko u szczepów gatunków izolowanych od zwierząt.

Spośród badanych paciorkowców wyizolowanych od zwierząt wyselekcjonowano dziewięć szczepów, których profil badanych cech chorobotwórczości był zbliżony do szczepów ludzkich, a wśród izolowanych od ludzi dwanaście takich, które zachowały cechy upodabniające je do szczepów „zwierzęcych”. Ich dalsze badanie, włączając w to sekwencjonowanie całych genomów i typowanie białka M może przynieść wyniki bardzo istotne dla tematu ich adaptacji do organizmu człowieka.

Szczepy *S. gallolyticus* pod wieloma względami odbiegały w swej charakterystyce od pozostałych. Przy cechach metabolicznych zbliżonych do szczepów izolowanych od zwierząt (zdolność rozkładu kazeiny i szeroki profil rozkładu cukrów), miały występujące powszechnie w szczepach *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* geny *isp1* i *dppA*.

Wśród szczepów *S. pseudintermedius* obu badanych grup powszechne były geny leukotoksyn i eksfoliatyn. Tylko szczepy izolowane od ludzi miały związany z powierzchnią komórki czynnik CF.

Ocena fenotypowa (antybiogram krążkowy, E-testy) i genetyczna lekowrażliwości badanych gatunków *Streptococcus* wskazała na ich wrażliwość wobec wielu antybiotyków, ale zaobserwowano częstą oporność dla makrolidów i linkozamidów oraz tetracyklin. Wśród szczepów *S. pseudintermedius* wiele było wielolekoopornych.

U szczepów każdego z badanych gatunków obserwowano dużą różnorodność cech chorobotwórczości i lekowrażliwości. Popiera to tezę o ich bardzo szerokim pangenomie. Nagromadzenie w pojedynczych szczepach cech sprzyjających przełamaniu bariery nowego gospodarza a następnie ich klonalna selekcja może doprowadzić do pojawienia się nowego ludzkiego patogenu. Analizując wyniki otrzymane dla badanych szczepów paciorkowców i gronkowców, można sądzić, że zdolności kolonizacyjne wyrażone w produkcji białek wiążących ECM nie są cechą o kluczowym znaczeniu. Natomiast u paciorkowców za najistotniejsze dla przełamania tej bariery należy uznać cechy pozwalające przeciwstawić się działaniom układu immunologicznego, w tym peptydazy C5a dopełniacza kodowanej przez gen *scp* i paciorkowcowego inhibitora dopełniacza przez gen *sicG*. Istotna może być również ekspresja genu *dppA* regulującego działanie toksyny paciorkowcowej oraz genu *isp1*, regulatorowego dla wielu toksyn paciorkowcowych, w tym białka M. Żadnego z tych genów nie można jednak jeszcze wskazać jako markera świadczącego o adaptacji do organizmu człowieka. W przypadku gronkowców gatunek *S. pseudintermedius* wydaje się już dobrze przystosowany do organizmu człowieka, a dalsze badania powinny koncentrować się na epidemiologii jego zakażeń, co pozwoliłoby ustalić długość łańcucha przekazywania szczepów patogennych między ludźmi. Przedstawiona praca doktorska wskazuje kierunki dalszych poszukiwań, których wynik może przyczynić się do wyjaśniania procesu adaptacji patogenów zwierzęcych do organizmu człowieka.

10. Summary

New human infectious diseases transmitted from animals have become more noticeable in recent years. Thus, the microorganisms that cause them are monitored in more detail. Among the "animal" bacteria with various pathogenic potentials for humans, there are representatives of the *Streptococcus* and *Staphylococcus* genera, the characteristics of which were analyzed in the presented doctoral dissertation. Species selected for research are indicated as the cause of human diseases to varying degrees and frequency.

The research aim was to evaluate the selected species' ability to adapt to the human host. The study was also aimed at assessing the degree of threat from emerging pathogens. It was assumed that the adaptation process of an animal pathogen to a human is influenced by features related to colonizing abilities and the ability to invade. The determinants (markers) that could influence this adaptation were sought. The aim was also to investigate what therapeutic options a physician may have in case of human infection with these strains.

All 93 strains studied in this work have been genetically identified. Previous identification of *Streptococcus* strains from human clinical specimens by MALDI TOF MS was genetically confirmed using the 16S rRNA primer *sdys* for *S. dysgalactiae* and the *tanB* and *sgp* primers for *S. gallolyticus* subspecies. Species rarely isolated from humans: *S. uberis*, *S. parauberis* and *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* was grown and selected by analyzing 660 bovine mastitis milk samples and identified phenotypically and genotypically using the *pauA* primers for *S. uberis* and *spa2152*, *spa2870* for *S. parauberis* identification. For strains new to this collection, *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* obtained by sequencing the 16S rRNA gene, the sequences were placed in the GenBank database. These strains were placed in the phylogenetic tree based on percent identity with other sequences identified at the subspecies level. In the case of the genus *Staphylococcus*, 14 strains of *S. pseudintermedius* isolated from both animal and human clinical materials were analyzed. They came from department collection and had been previously identified genetically. To assess the phylogenetic relationship, the housekeeping genes of these strains were sequenced, and MLST analysis was performed. Sequences were also placed in the GenBank database.

In the study, growing methods and metabolic and biological properties were used. Genes were searched by PCR based on sequences derived from *S. pyogenes* and *S. dysgalactiae* in streptococci and *S. aureus* and *S. pseudintermedius* in staphylococci. In selected strains of the genus *Streptococcus*, the expression of some genes of invasins, streptokinase, complement peptidase C5a, streptococcal complement inhibitor and phospholipase A2 was studied.

Among the assessed metabolic features of streptococci, caseinase and broad saccharolytic abilities, including sorbitol degradation, were characteristic of strains isolated from animals. Among this group of strains, the gene encoding hyaluronan lyase (*hylB*) was rare, characteristic of strains isolated from humans. ECM adhesion genes responsible for colonizing the studied streptococci (*hylB*, *fbp*, *cbp* and *prtF1*) were more numerous in *S. dysgalactiae* strains than in other streptococcal species. In *Staphylococcus pseudintermedius* strains, genes responsible for ECM binding and colonization were detected in a similar number in "human" and "animal" strains. Still, only strains isolated from animals had *spsP* and *spsQ* genes.

In the assessment of the invasiveness of the strains, special attention was paid to streptokinase. The *ska* gene encoding it was present in all *S. dysgalactiae* and numerous strains of other species, but it was not expressed in all strains examined. The activation level of human and bovine plasminogen was also differentiated, showing that this feature can be considered in assessing potential adaptation to humans as a new host. A feature that significantly differentiated "human" and "animal" strains, but not species, was the ability to grow in the presence of bovine and human serum. Only in the genomes of strains of *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis*, isolated from humans, the streptococcal complement inhibitor gene *sicG* was found, but the DNase gene *sdn* was found only in strains of the species isolated from animals.

Among the tested streptococci isolated from animals, nine strains were selected whose pathogenicity profile was similar to human strains, and among those isolated from humans, twelve strains were selected that retained characteristics similar to "animal" strains. Further study on these strains, including whole genome sequencing and M protein typing, may yield significant results for their adaptation to the human body.

The strains of *S. gallolyticus* differed in their characteristics from the others in many respects. With metabolic features similar to strains isolated from animals (the ability to decompose casein and a broad profile of sugar decomposition), they had *isp1* and *dppA* genes, common to strains of *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis*.

Genes of leukotoxins and exfoliatins were common among *S. pseudintermedius* strains of both studied groups. Only strains isolated from humans had cell surface-bound factor CF.

Phenotypic (disc antibiogram, E-tests) and genetic drug susceptibility assessment of the tested *Streptococcus* species indicated their sensitivity to many antibiotics. However, frequent resistance to macrolides, lincosamides and tetracyclines was observed. Many *S. pseudintermedius* strains were multidrug resistant.

A large variety of pathogenicity and drug susceptibility characteristics was observed in the strains of each studied species. This confirms the thesis of their very wide pangenome. The accumulation of traits conducive to breaking the barrier of

a new host in single strains, followed by their clonal selection, may lead to the emergence of a new human pathogen. After analyzing the results obtained for the tested strains of streptococci and staphylococci, it can be assumed that the colonizing ability expressed in the production of ECM binding proteins is not a feature of key importance. On the other hand, the most important for overcoming this barrier in streptococci are the features that allow opposing the actions of the immune system, including the C5a complement peptidase encoded by the *scp* gene and the streptococcal complement inhibitor by the *sicG* gene. The expression of the *dppA* gene, which regulates the action of the streptococcal toxin, and the *isp1* gene, which regulates many streptococcal toxins, including the M protein, may also be important. However, none of these genes can yet be indicated as a marker of adaptation to the human body. In the case of staphylococci, the species *S. pseudintermedius* seems to be well adapted to the human body, and further research should focus on the epidemiology of its infections, which would allow us to determine the length of the transmission chain of pathogenic strains between people. The presented doctoral thesis indicates the directions of further research, the result of which may contribute to explaining the process of adaptation of animal pathogens to the human body.

11. Piśmiennictwo

- Abdullahi, I. N., Zarazaga, M., Campana-Burguet, A., Eguizabal, P., Lozano, C., & Torres, C. (2022). Nasal *Staphylococcus aureus* and *S. pseudintermedius* carriage in healthy dogs and cats: a systematic review of their antibiotic resistance, virulence and genetic lineages of zoonotic relevance [Review]. *Journal of Applied Microbiology*, *133*(6), 3368-3390. <https://doi.org/10.1111/jam.15803>
- Acke, E., Midwinter, A. C., Lawrence, K., Gordon, S. J. G., Moore, S., Rasiyah, I., . . . Waller, A. (2015). Prevalence of *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* and *S. equi* subsp. *zooepidemicus* in a sample of healthy dogs, cats and horses [Article]. *New Zealand Veterinary Journal*, *63*(5), 265-271. <https://doi.org/10.1080/00480169.2015.1016133>
- Alves-Barroco, C., Botelho, A. M. N., Americo, M. A., Fracalanza, S. E. L., de Matos, A. P. A., Guimaraes, M. A., . . . Fernandes, A. R. (2022). Assessing in vivo and in vitro biofilm development by *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* using a murine model of catheter-associated biofilm and human keratinocyte cell [Article]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *12*, 12, Article 874694. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.874694>
- Alves-Barroco, C., Brito, P. H., Santos-Sanches, I., & Fernandes, A. R. (2022). Phylogenetic analysis and accessory genome diversity reveal insight into the evolutionary history of *Streptococcus dysgalactiae* [Article]. *Frontiers in Microbiology*, *13*, 16, Article 952110. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.952110>
- Alves-Barroco, C., Rivas-Garcia, L., Fernandes, A. R., & Baptista, P. V. (2020). Tackling Multidrug Resistance in Streptococci - From Novel Biotherapeutic Strategies to Nanomedicines [Review]. *Frontiers in Microbiology*, *11*, 21, Article 579916. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.579916>
- Alves-Barroco, C., Roma-Rodrigues, C., Raposo, L. R., Bras, C., Diniz, M., Caco, J., . . . Fernandes, A. R. (2019). *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* isolated from milk of the bovine udder as emerging pathogens: In vitro and in vivo infection of human cells and zebrafish as biological models [Article]. *Microbiologyopen*, *8*(1), 13, Article e623. <https://doi.org/10.1002/mbo3.623>
- Amari, S., Warda, K., Bouraddane, M., Katfy, M., Elkamouni, Y., Arsalane, L., . . . Bouskraoui, M. (2023). Antibiotic Resistance of *Streptococcus pneumoniae* in the Nasopharynx of Healthy Children Less than Five Years Old after the Generalization of Pneumococcal Vaccination in Marrakesh, Morocco [Article]. *Antibiotics-Basel*, *12*(3), 12, Article 442. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12030442>
- Andreoni, F., Ugolini, F., Keller, N., Neff, A., Nizet, V., Hollands, A., . . . Schuepbach, R. A. (2018). Immunoglobulin Attenuates Streptokinase-Mediated Virulence in *Streptococcus dysgalactiae* Subspecies *equisimilis* Necrotizing Fasciitis [Article]. *Journal of Infectious Diseases*, *217*(2), 270-279. <https://doi.org/10.1093/infdis/jix560>
- Arafa, A. A., Hedia, R. H., Ata, N. S., & Ibrahim, E. S. (2021). Vancomycin resistant *Streptococcus equi* subsp. *equi* isolated from equines suffering from respiratory manifestation in Egypt [Article]. *Veterinary World*, *14*(7), 1808-1814. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2021.1808-1814>

- Aslantas, O., Olgun, E., Bayirli, M., & Buyukaltay, K. (2023). Molecular Characterization of Methicillin- and Multidrug-Resistant *Staphylococcus pseudintermedius* Strain Isolated from a Case of Feline Otitis Externa [Article]. *Israel Journal of Veterinary Medicine*, 78(1), 34-38.
- Aydin, F., Gunes, V., Bayram, L. C., Abay, S., Karakaya, E., Varol, K., . . . Diker, K. S. (2019). Neonatal calf meningitis associated with *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* [Article]. *Folia Microbiologica*, 64(2), 223-229. <https://doi.org/10.1007/s12223-018-0649-5>
- Babbar, A., Itzek, A., Pieper, D. H., & Nitsche-Schmitz, D. P. (2018). Detection of *Streptococcus pyogenes* virulence genes in *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* from Vellore, India [Article]. *Folia Microbiologica*, 63(5), 581-586. <https://doi.org/10.1007/s12223-018-0595-2>
- Balachandran, M., Bemis, D. A., & Kania, S. A. (2018). Expression and function of protein A in *Staphylococcus pseudintermedius* [Article]. *Virulence*, 9(1), 390-401. <https://doi.org/10.1080/21505594.2017.1403710>
- Baracco, G. J. (2019). Infections Caused by Group C and G *Streptococcus* (*Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* and Others): Epidemiological and Clinical Aspects [Article]. *Microbiology Spectrum*, 7(2), 11, Article Gpp3-0016-2018. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0016-2018>
- Barros, R. R. (2021). Antimicrobial Resistance among Beta-Hemolytic *Streptococcus* in Brazil: An Overview [Review]. *Antibiotics-Basel*, 10(8), 10, Article 973. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10080973>
- Ben Zakour, N. L., Beatson, S. A., van den Broek, A. H. M., Thoday, K. L., & Fitzgerald, J. R. (2012). Comparative genomics of the *Staphylococcus intermedius* group of animal pathogens [Article]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2, 15, Article 44. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00044>
- Berbel, D., Gonzalez-Diaz, A., de Egea, G. L., Camara, J., & Ardanuy, C. (2022). An Overview of Macrolide Resistance in Streptococci: Prevalence, Mobile Elements and Dynamics [Review]. *Microorganisms*, 10(12), 23, Article 2316. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10122316>
- Beres, S. B., Olsen, R. J., Long, S. W., Eraso, J. M., Boukthir, S., Faili, A., . . . Musser, J. M. (2023). Analysis of the Genomics and Mouse Virulence of an Emergent Clone of *Streptococcus dysgalactiae* Subspecies *equisimilis* [Article; Early Access]. *Microbiology Spectrum*, 14. <https://doi.org/10.1128/spectrum.04550-22>
- Besancon, H., Babiychuk, V., Larpin, Y., Koffel, R., Schittny, D., Brockhus, L., . . . Babiychuk, E. (2021). Tailored liposomal nanotraps for the treatment of Streptococcal infections [Article]. *Journal of Nanobiotechnology*, 19(1), 15, Article 46. <https://doi.org/10.1186/s12951-021-00775-x>
- Bhat, A. H. (2021). Bacterial zoonoses transmitted by household pets and as reservoirs of antimicrobial resistant bacteria [Article]. *Microbial Pathogenesis*, 155, 8, Article 104891. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2021.104891>
- Bhooshan, S., Negi, V., & Khatri, P. K. (2020). *Staphylococcus pseudintermedius*: an undocumented, emerging pathogen in humans [Review]. *Gms Hygiene and Infection Control*, 15, 11, Article Doc32. <https://doi.org/10.3205/dgkh000367>
- Bicmen, M., Gulay, Z., Ramaswamy, S. V., Musher, D. M., & Gur, D. (2006). Analysis of mutations in the *pbp* genes of penicillin-non-susceptible pneumococci from Turkey [Article; Proceedings Paper]. *Clinical*

- Microbiology and Infection*, 12(2), 150-155. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2005.01334.x>
- Blaecher, C., Bauwens, E., Tay, A., Peters, F., Dobbs, S., Dobbs, J., . . . Smet, A. (2017). A novel isolation protocol and probe-based RT-PCR for diagnosis of gastric infections with the zoonotic pathogen *Helicobacter suis* [Article]. *Helicobacter*, 22(3), 11, Article e12369. <https://doi.org/10.1111/hel.12369>
- Blancou, J., Chomel, B. B., Belotto, A., & Meslin, F. X. (2005). Emerging or re-emerging bacterial zoonoses: factors of emergence, surveillance and control [Review]. *Veterinary Research*, 36(3), 507-522. <https://doi.org/10.1051/vetres:2005008>
- Boonyayatra, S., Tharavichitkul, P., & Oliver, S. P. (2018). Virulence-associated genes and molecular typing of *Streptococcus uberis* associated with bovine mastitis in northern Thailand [Article]. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*, 42(1), 73-81. <https://doi.org/10.3906/vet-1704-75>
- Brandt, C. M., Schweizer, K. G., Holland, R., Luticken, R., & Freyaldenhoven, B. S. (2005). Lack of mitogenic activity of speG- and speG(dys)-positive *Streptococcus dysgalactiae* subspecies *equisimilis* isolates from patients with invasive infections [Article; Proceedings Paper]. *International Journal of Medical Microbiology*, 295(8), 539-546. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2005.07.013>
- Britton, E. R., Ibberson, C. B., Horswill, A. R., & Cech, N. B. (2015). A new mass spectrometry based bioassay for the direct assessment of hyaluronidase activity and inhibition [Article]. *Journal of Microbiological Methods*, 119, 163-167. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2015.10.019>
- Brouwer, S., Barnett, T. C., Rivera-Hernandez, T., Rohde, M., & Walker, M. J. (2016). *Streptococcus pyogenes* adhesion and colonization. *Febs Letters*, 590(21), 3739-3757. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12254>
- Brouwer, S., Rivera-Hernandez, T., Curren, B. F., Harbison-Price, N., De Oliveira, D. M. P., Jespersen, M. G., . . . Walker, M. J. (2023). Pathogenesis, epidemiology and control of Group A *Streptococcus* infection [Review; Early Access]. *Nature Reviews Microbiology*, 17. <https://doi.org/10.1038/s41579-023-00865-7>
- Brown, H. L., Metters, G., Hitchings, M. D., Wilkinson, T. S., Sousa, L., Cooper, J., . . . Jenkins, R. (2020). Antibacterial and Antivirulence Activity of Manuka Honey against Genetically Diverse *Staphylococcus pseudintermedius* Strains [Article]. *Applied and Environmental Microbiology*, 86(20), 14, Article e01768-20. <https://doi.org/10.1128/aem.01768-20>
- Bryan, J. D., & Shelver, D. W. (2009). *Streptococcus agalactiae* CspA Is a Serine Protease That Inactivates Chemokines [Article]. *Journal of Bacteriology*, 191(6), 1847-1854. <https://doi.org/10.1128/jb.01124-08>
- Burnham, J. P., & Kollef, M. H. (2018). Treatment of severe skin and soft tissue infections: a review [Review]. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 31(2), 113-119. <https://doi.org/10.1097/qco.0000000000000431>
- Burova, L. A., & Artem, A. T. (2022). MAJOR PATHOGENICITY FACTORS OF *STREPTOCOCCUS PYOGENES* [Review]. *Infektsiya I Immunitet*, 12(1), 33-50. <https://doi.org/10.15789/2220-7619-mpf-1723>
- Butt, J., Blot, W. J., Teras, L. R., Visvanathan, K., Le Marchand, L., Haiman, C. A., . . . Epplein, M. (2018). Antibody Responses to *Streptococcus Gallolyticus* Subspecies *Gallolyticus* Proteins in a Large Prospective Colorectal Cancer

- Cohort Consortium [Article]. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 27(10), 1186-1194. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.epi-18-0249>
- Caballero, R. R., Lottenberg, R., & Johnston, K. H. (1999). Cloning, expression, sequence analysis, and characterization of streptokinases secreted by porcine and equine isolates of *Streptococcus equisimilis* [Article]. *Infection and Immunity*, 67(12), 6478-6486.
- Cantas, L., & Suer, K. (2014). Review: the important bacterial zoonoses in "One Health" concept [Review]. *Frontiers in Public Health*, 2, 8, Article 144. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2014.00144>
- Casagrande Proietti, P., Stefanetti, V., Hyatt, D. R., Marenzoni, M. L., Capomaccio, S., Coletti, M., . . . Passamonti, F. (2015). Phenotypic and genotypic characterization of canine pyoderma isolates of *Staphylococcus pseudintermedius* for biofilm formation [Article]. *Journal of Veterinary Medical Science*, 77(8), 945-951. <https://doi.org/10.1292/jvms.15-0043>
- Castro, S. A., & Dorfmüller, H. C. (2021). A brief review on Group A *Streptococcus* pathogenesis and vaccine development [Review]. *Royal Society Open Science*, 8(3), 17, Article 201991. <https://doi.org/10.1098/rsos.201991>
- Cavalcante, F. S., Saintive, S., Ferreira, D. C., Silva, A. B. R., Guimaraes, L. C., Braga, B. S., . . . dos Santos, K. R. N. (2021). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from infected skin lesions present several virulence genes and are associated with the CC30 in Brazilian children with atopic dermatitis [Article]. *Virulence*, 12(1), 260-269. <https://doi.org/10.1080/21505594.2020.1869484>
- Chen, W. C., Lee, P. I., Lin, H. C., Chang, L. Y., Lee, T. F., Chen, J. M., & Hsueh, P. R. (2021). Clustering of *Streptococcus gallolyticus* subspecies *pasteurianus* bacteremia and meningitis in neonates [Article]. *Journal of Microbiology Immunology and Infection*, 54(6), 1078-1085. <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2020.07.004>
- Cheng, Q., Stafslin, D., Purushothaman, S. S., & Cleary, P. (2002). The group B streptococcal C5a peptidase is both a specific protease and an invasins [Article]. *Infection and Immunity*, 70(5), 2408-2413. <https://doi.org/10.1128/iai.70.5.2408-2413.2002>
- Chennapragada, S. S., Ramphul, K., Barnett, B. J., Mejias, S. G., & Lohana, P. (2018). A Rare Case of *Streptococcus dysgalactiae* Subsp. *Dysgalactiae* Human Zoonotic Infection [Article]. *Cureus*, 10(7), 4, Article UNSP e2901. <https://doi.org/10.7759/cureus.2901>
- Choi, S. S., Lee, J. W., Kang, Y. Y., & Ha, N. J. (2003). Antimicrobial resistance patterns of vancomycin-resistant *Streptococcus equinus* isolated from animal foods and epidemiological typing of resistant *S. equinus* by microbial uniprimer kit [Article]. *Archives of Pharmacal Research*, 26(8), 638-643. <https://doi.org/10.1007/bf02976713>
- Christensen, G. D., Simpson, W. A., Younger, J. J., Baddour, L. M., Barrett, F. F., Melton, D. M., & Beachey, E. H. (1985). ADHERENCE OF COAGULASE-NEGATIVE STAPHYLOCOCCI TO PLASTIC TISSUE-CULTURE PLATES - A QUANTITATIVE MODEL FOR THE ADHERENCE OF STAPHYLOCOCCI TO MEDICAL DEVICES [Article]. *Journal of Clinical Microbiology*, 22(6), 996-1006. <https://doi.org/10.1128/jcm.22.6.996-1006.1985>
- Chrobak-Chmiel, D., Golke, A., Dembele, K., Cwiek, K., Kizerwetter-Swida, M., Rzewuska, M., & Binek, M. (2018). *Staphylococcus pseudintermedius*, both

- commensal and pathogen [Review]. *Medycyna Weterynaryjna-Veterinary Medicine-Science and Practice*, 74(6), 362-370. <https://doi.org/10.21521/mw.6042>
- Cockburn, W. C., Mendy, R. M., Meyer, K. F., Miles, J. A. R., Muller, J., Parnas, J., . . . Wolff, J. W. (1959). *Joint WHO/FAO Expert Committee on Zoonoses, Second Report* (Technical Report Series, Issue. W. H. Organization.
- Cook, S. M., Skora, A., Gillen, C. M., Walker, M. J., & McArthur, J. D. (2012). Streptokinase variants from *Streptococcus pyogenes* isolates display altered plasminogen activation characteristics - implications for pathogenesis [Article]. *Molecular Microbiology*, 86(5), 1052-1062. <https://doi.org/10.1111/mmi.12037>
- Corredoira, J., Alonso, M. P., Garcia-Garrote, F., Garcia-Pais, M. J., Coira, A., Rabunal, R., . . . Varela, J. (2014). *Streptococcus bovis* group and biliary tract infections: an analysis of 51 cases [Article]. *Clinical Microbiology and Infection*, 20(5), 405-409. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12333>
- Cortes-Penfield, N., & Ryder, J. H. (2023). Should Linezolid Replace Clindamycin as the Adjunctive Antimicrobial of Choice in Group A Streptococcal Necrotizing Soft Tissue Infection and Toxic Shock Syndrome? A Focused Debate [Article]. *Clinical Infectious Diseases*, 76(2), 346-350. <https://doi.org/10.1093/cid/ciac720>
- Cuny, C., Arnold, P., Hermes, J., Eckmanns, T., Mehraj, J., Schoenfelder, S., . . . Witte, W. (2017). Occurrence of cfr-mediated multiresistance in staphylococci from veal calves and pigs, from humans at the corresponding farms, and from veterinarians and their family members [Article]. *Veterinary Microbiology*, 200, 88-94. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.04.002>
- Cuny, C., Layer-Nicolaou, F., Weber, R., Kock, R., & Witte, W. (2022). Colonization of Dogs and Their Owners with *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* in Households, Veterinary Practices, and Healthcare Facilities [Article]. *Microorganisms*, 10(4), 15, Article 677. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10040677>
- Devaux, C. A., Mediannikov, O., Medkour, H., & Raoult, D. (2019). Infectious Disease Risk Across the Growing Human-Non Human Primate Interface: A Review of the Evidence [Review]. *Frontiers in Public Health*, 7, 22, Article 305. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2019.00305>
- Di Blasio, A., Traversa, A., Giacometti, F., Chiesa, F., Piva, S., Decastelli, L., . . . Zoppi, S. (2019). Isolation of *Arcobacter* species and other neglected opportunistic agents from aborted bovine and caprine fetuses [Article]. *Bmc Veterinary Research*, 15, 7, Article 257. <https://doi.org/10.1186/s12917-019-2009-3>
- Dore, S., Liciardi, M., Amatiste, S., Bergagna, S., Bolzoni, G., Caligiuri, V., . . . Cannas, E. A. (2016). Survey on small ruminant bacterial mastitis in Italy, 2013-2014 [Article]. *Small Ruminant Research*, 141, 91-93. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2016.07.010>
- dos Santos, K. M. O., de Matos, C. R., Salles, H. O., Franco, B., Arellano, K., Holzapfel, W. H., & Todorov, S. D. (2020). Exploring Beneficial/Virulence Properties of Two Dairy-Related Strains of *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius* [Article]. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 12(4), 1524-1541. <https://doi.org/10.1007/s12602-020-09637-8>

- Dumke, J., Vollmer, T., Akkermann, O., Knabbe, C., & Dreier, J. (2017). Case-control study: Determination of potential risk factors for the colonization of healthy volunteers with *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* [Article]. *Plos One*, *12*(5), 12, Article e0176515. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176515>
- El Aamri, F., Remuzgo-Martinez, S., Acosta, F., Real, F., Ramos-Vivas, J., Icardo, J. M., & Padilla, D. (2015). Interactions of *Streptococcus iniae* with phagocytic cell line [Article]. *Microbes and Infection*, *17*(4), 258-265. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2014.06.006>
- Eryildiz, C., Bukavaz, S., Gurcan, S., & Hatipoglu, O. (2017). A Rarely Isolated Bacterium in Microbiology Laboratories: *Streptococcus uberis* [Article]. *Mikrobiyoloji Bulteni*, *51*(2), 171-176. <https://doi.org/10.5578/mb.40378>
- EUCAST. (2019). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters, ver. 9.0. In (9.0 ed.). https://www.eucast.org/clinical_breakpoints/: The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing.
- EUCAST. (2023). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters, ver. 13.0. In (13.0 ed.). https://www.eucast.org/clinical_breakpoints/: The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing.
- Fabregas, N., Perez, D., Vines, J., Cusco, A., Migura-Garcia, L., Ferrer, L., & Francino, O. Diverse Populations of *Staphylococcus pseudintermedius* Colonize the Skin of Healthy Dogs [Article; Early Access]. *Microbiology Spectrum*, *16*. <https://doi.org/10.1128/spectrum.03393-22>
- Faye, A., Lorrot, M., Bidet, P., Bonacorsi, S., & Cohen, R. (2014). Management of severe invasive group A streptococcal infections [Article]. *Archives De Pediatrie*, *21*, S87-S92. [https://doi.org/10.1016/s0929-693x\(14\)72267-5](https://doi.org/10.1016/s0929-693x(14)72267-5)
- Ferrer, L., Garcia-Fonticoba, R., Perez, D., Vines, J., Fabregas, N., Madronero, S., . . . Francino, O. (2021). Whole genome sequencing and de novo assembly of *Staphylococcus pseudintermedius*: a pangenome approach to unravelling pathogenesis of canine pyoderma [Article]. *Veterinary Dermatology*, *32*(6), 654-663. <https://doi.org/10.1111/vde.13040>
- Fessia, A. S., & Odierno, L. M. (2021). Potential factors involved in the early pathogenesis of *Streptococcus uberis* mastitis: a review [Review]. *Folia Microbiologica*, *66*(4), 509-523. <https://doi.org/10.1007/s12223-021-00879-9>
- Filcek, K., Vielfort, K., Muraleedharan, S., Henriksson, J., Valdivia, R. H., Bavoil, P. M., & Sixt, B. S. (2019). Insertional mutagenesis in the zoonotic pathogen *Chlamydia caviae* [Article]. *Plos One*, *14*(11), 17, Article e0224324. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0224324>
- Filipczak, N., Li, X., Saawant, G. R., Yalamarty, S. S. K., Luther, E., & Torchilin, V. P. (2023). Antibody-modified DNase I micelles specifically recognize the neutrophil extracellular traps (NETs) and promote their degradation [Article]. *Journal of Controlled Release*, *354*, 109-119. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2022.12.062>
- Frenkel, J. S. (2014). The role of hyaluronan in wound healing [Article]. *International Wound Journal*, *11*(2), 159-163. <https://doi.org/10.1111/j.1742-481X.2012.01057.x>
- Fulde, M., & Valentin-Weigand, P. (2013). Epidemiology and Pathogenicity of Zoonotic Streptococci. In *Host-Pathogen Interactions in Streptococcal Diseases* (Vol. 368, pp. 49-81). Springer-Verlag Berlin. https://doi.org/10.1007/82_2012_277

- Fuursted, K., Stegger, M., Hoffmann, S., Lambertsen, L., Andersen, P. S., Deleuran, M., & Thomsen, M. K. (2016). Description and characterization of a penicillin-resistant *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* clone isolated from blood in three epidemiologically linked patients [Article]. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 71(12), 3376-3380. <https://doi.org/10.1093/jac/dkw320>
- Gao, X. Y., Zhi, X. Y., Li, H. W., Klenk, H. P., & Li, W. J. (2014). Comparative Genomics of the Bacterial Genus *Streptococcus* Illuminates Evolutionary Implications of Species Groups [Article]. *Plos One*, 9(6), 12, Article e101229. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0101229>
- Gauthier, D. T. (2015). Bacterial zoonoses of fishes: A review and appraisal of evidence for linkages between fish and human infections [Review]. *Veterinary Journal*, 203(1), 27-35. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2014.10.028>
- Gherardi, G., Palmieri, C., Marini, E., Pompilio, A., Crocetta, V., Di Bonaventura, G., . . . Facinelli, B. (2016). Identification, antimicrobial resistance and molecular characterization of the human emerging pathogen *Streptococcus gallolyticus* subsp. *pasteurianus* [Article]. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 86(4), 329-335. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2016.09.019>
- Glajzner, P., Szewczyk, E. M., & Szemraj, M. (2021). Pathogenicity and drug resistance of animal streptococci responsible for human infections [Review]. *Journal of Medical Microbiology*, 70(3), 19, Article 001339. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.001339>
- Glajzner, P., Szewczyk, E. M., & Szemraj, M. (2023a). Pathogenic potential and antimicrobial resistance of *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from human and animals [Article; Early Access]. *Folia Microbiologica*, 13. <https://doi.org/10.1007/s12223-022-01007-x>
- Glajzner, P., Szewczyk, E. M., & Szemraj, M. (2023b). Phenotypic and genotypic characterization of antimicrobial resistance in streptococci isolated from human and animal clinical specimens. *Current Microbiology*, 80:228. <https://doi.org/10.1007/s00284-023-03337-6>
- Gonzalez-Martin, M., Corbera, J. A., Suarez-Bonnet, A., & Tejedor-Junco, M. T. (2020). Virulence factors in coagulase-positive staphylococci of veterinary interest other than *Staphylococcus aureus* [Review]. *Veterinary Quarterly*, 40(1), 118-131. <https://doi.org/10.1080/01652176.2020.1748253>
- Goodfellow, A. M., Hibble, M., Talay, S. R., Kreikemeyer, B., Currie, B. J., Sriprakash, K. S., & Chhatwal, G. S. (2000). Distribution and antigenicity of fibronectin binding proteins (SfbI and SfbII) of *Streptococcus pyogenes* clinical isolates from the Northern Territory, Australia [Article]. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(1), 389-392.
- Gortazar, C., Reperant, L. A., Kuiken, T., de la Fuente, J., Boadella, M., Martinez-Lopez, B., . . . Mysterud, A. (2014). Crossing the Interspecies Barrier: Opening the Door to Zoonotic Pathogens [Article]. *Plos Pathogens*, 10(6), 5, Article e1004129. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004129>
- Graham, M. R., Smoot, L. M., Migliaccio, C. A. L., Virtaneva, K., Sturdevant, D. E., Porcella, S. F., . . . Musser, J. M. (2002). Virulence control in group A *Streptococcus* by a two-component gene regulatory system: Global expression profiling and in vivo infection modeling [Article]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(21), 13855-13860. <https://doi.org/10.1073/pnas.202353699>

- Haenni, M., Lupo, A., & Madec, J. Y. (2018). Antimicrobial Resistance in *Streptococcus* spp [Article]. *Microbiology Spectrum*, 6(2), 25, Article Unsp arba-0008-2017. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.ARBA-0008-2017>
- Haenni, M., & Moreillon, P. (2006). Mutations in penicillin-binding protein (PBP) genes and in non-PBP genes during selection of penicillin-resistant *Streptococcus gordonii* [Article]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(12), 4053-4061. <https://doi.org/10.1128/aac.00676-06>
- Hakenbeck, R., Denapaite, D., & Maurer, P. (2012). Mechanisms of Penicillin Resistance in *Streptococcus pneumoniae*: Targets, Gene Transfer and Mutations. In T. J. Dougherty & M. J. Pucci (Eds.), *Antibiotic Discovery and Development, Vols 1 and 2* (pp. 593-616). Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-1400-1_18
- Hasegawa, T., Matsumoto, M., Hata, N., Yano, H., Isaka, M., & Tatsuno, I. (2019). Homologous role of CovRS two-component regulatory system in NAD(+)-glycohydrolase activity in *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* as in *Streptococcus pyogenes* [Article]. *Apmis*, 127(2), 87-92. <https://doi.org/10.1111/apm.12914>
- Hatrongjit, R., Akeda, Y., Hamada, S., Gottschalk, M., & Kerdsin, A. (2017). Multiplex PCR for identification of six clinically relevant streptococci [Article]. *Journal of Medical Microbiology*, 66(11), 1590-1595. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000615>
- Hlebowicz, M., Jakubowski, P., & Smiatacz, T. (2019). *Streptococcus suis* Meningitis: Epidemiology, Clinical Presentation and Treatment [Review]. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 19(8), 557-562. <https://doi.org/10.1089/vbz.2018.2399>
- Holden, M. T. G., Heather, Z., Paillot, R., Steward, K. F., Webb, K., Ainslie, F., . . . Waller, A. S. (2009). Genomic Evidence for the Evolution of *Streptococcus equi*: Host Restriction, Increased Virulence, and Genetic Exchange with Human Pathogens [Article]. *Plos Pathogens*, 5(3), 14, Article e1000346. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000346>
- Hoppe, P. A., Holzhauser, S., Lala, B., Buhner, C., Gratopp, A., Hanitsch, L. G., . . . Kruger, R. (2019). Severe infections of Panton-Valentine leukocidin positive *Staphylococcus aureus* in children [Article]. *Medicine*, 98(38), 7, Article e17185. <https://doi.org/10.1097/md.00000000000017185>
- Huan, S., Tan, J. S. W., & Chin, A. Y. H. (2020). *Streptococcus parauberis* infection of the hand [Letter; Early Access]. *Journal of Hand Surgery-European Volume*, 2, Article 1753193420938504. <https://doi.org/10.1177/1753193420938504>
- Huish, S., Thelwell, C., & Longstaff, C. (2017). Activity Regulation by Fibrinogen and Fibrin of Streptokinase from *Streptococcus Pyogenes* [Article]. *Plos One*, 12(1), 16, Article e0170936. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170936>
- Hule, G. P., Karmarkar, M. G., Cameron, A., Hase, N., Khopkar, U., Mehta, P. R., . . . Sriprakash, K. S. (2015). Seropositivity for Antibodies to DRS-G, a Virulence Factor from *Streptococcus dysgalactiae* subsp *equisimilis*, Is an Independent Risk Factor for Poststreptococcus Glomerulonephritis and Chronic Kidney Disease in Mumbai, India [Article]. *Clinical and Vaccine Immunology*, 22(8), 938-942. <https://doi.org/10.1128/cvi.00275-15>
- Ismail, A. A., Shaker, B. T., & Bajou, K. (2022). The Plasminogen-Activator Plasmin System in Physiological and Pathophysiological Angiogenesis [Review].

- International Journal of Molecular Sciences*, 23(1), 19, Article 337. <https://doi.org/10.3390/ijms23010337>
- Jahagirdar, S., Morris, L., Benis, N., Oppegaard, O., Svenson, M., Hyldegaard, O., . . . Grp, I. S. (2022). Analysis of host-pathogen gene association networks reveals patient-specific response to streptococcal and polymicrobial necrotising soft tissue infections [Article]. *Bmc Medicine*, 20(1), 18, Article 173. <https://doi.org/10.1186/s12916-022-02355-8>
- Jans, C., & Boleij, A. (2018). The Road to Infection: Host-Microbe Interactions Defining the Pathogenicity of *Streptococcus bovis*/*Streptococcus equinus* Complex Members [Review]. *Frontiers in Microbiology*, 9, 32, Article 603. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00603>
- Jans, C., Meile, L., Lacroix, C., & Stevens, M. J. A. (2015). Genomics, evolution, and molecular epidemiology of the *Streptococcus bovis*/*Streptococcus equinus* complex (SBSEC) [Article]. *Infection Genetics and Evolution*, 33, 419-436. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.09.017>
- Javed, S., Gul, F., Javed, K., & Bokhari, H. (2017). *Helicobacter pullorum*: An Emerging Zoonotic Pathogen [Review]. *Frontiers in Microbiology*, 8, 8, Article 604. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00604>
- Jeric, P. E., Lopardo, H., Vidal, P., Arduino, S., Fernandez, A., Orman, B. E., . . . Centron, D. (2002). Multicenter study on spreading of the tet(M) gene in tetracycline-resistant *Streptococcus* group G and C isolates in Argentina [Article]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(1), 239-241. <https://doi.org/10.1128/aac.46.2.239-241.2002>
- Jolley, K. A.-O., Bray, J. A.-O., & Maiden, M. A.-O. (2018). Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications. 3(124). <https://doi.org/https://doi.org/10.12688/wellcomeopenres.14826.1>
- Joosten, M., Flahou, B., Meyns, T., Smet, A., Arts, J., De Cooman, L., . . . Haesebrouck, F. (2013). Case Report: *Helicobacter suis* Infection in a Pig Veterinarian [Article]. *Helicobacter*, 18(5), 392-396. <https://doi.org/10.1111/hel.12054>
- Jordal, S., Glambek, M., Oppegaard, O., & Kittang, B. R. (2015). New Tricks from an Old Cow: Infective Endocarditis Caused by *Streptococcus dysgalactiae* subsp *dysgalactiae* [Article]. *Journal of Clinical Microbiology*, 53(2), 731-734. <https://doi.org/10.1128/jcm.02437-14>
- Kaczorek, E., Malaczewska, J., Wojcik, R., Rekawek, W., & Siwicki, A. K. (2017). Phenotypic and genotypic antimicrobial susceptibility pattern of *Streptococcus* spp. isolated from cases of clinical mastitis in dairy cattle in Poland [Article]. *Journal of Dairy Science*, 100(8), 6442-6453. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-12660>
- Kaindi, D. W. M., Kogi-Makau, W., Lule, G. N., Kreikemeyer, B., Renault, P., Bonfoh, B., . . . Jans, C. (2018). Colorectal cancer-associated *Streptococcus infantarius* subsp *infantarius* differ from a major dairy lineage providing evidence for pathogenic, pathobiont and food-grade lineages [Article]. *Scientific Reports*, 8, 11, Article 9181. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-27383-4>
- Kalhor, D. H., Gao, S., Kalhor, M. S., Parveen, F., Tariq, M., Pirzado, S. A., & Liu, Y. J. (2017). STAPHYLO COCCUS PSEUDINTERMEDIUS ISOLATION FROM CANINE, BACTERIAL COLONIZATION AND CLINICAL

- PICTURE IN BALB/C MOUSE MODEL [Article]. *Journal of Animal and Plant Sciences*, 27(2), 422-429.
- Kang, M. H., Chae, M. J., Yoon, J. W., Kim, S. G., Lee, S. Y., Yoo, J. H., & Park, H. M. (2014). Antibiotic resistance and molecular characterization of ophthalmic *Staphylococcus pseudintermedius* isolates from dogs. *Journal of Veterinary Science*, 15(3), 409-415. <https://doi.org/10.4142/jvs.2014.15.3.409>
- Keramati, M., Aslani, M. M., & Roohvand, F. (2020). In silico design and in vitro validation of a novel PCR-RFLP assay for determination of phylogenetic clusters of streptokinase gene alleles in streptococci groups [Article]. *Microbial Pathogenesis*, 139, 8, Article 103862. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103862>
- Kessel, S., & Wittenberg, C. E. (2008). Joint infection in a young patient caused by *Streptococcus uberis*, a pathogen of bovine mastitis - A case report [Article]. *Zeitschrift Fur Orthopadie Und Unfallchirurgie*, 146(4), 507-509. <https://doi.org/10.1055/s-2007-989352>
- Khairullah, A. R., Sudjarwo, S. A., Effendi, M. H., Ramandinianto, S. C., Gelolodo, M. A., Widodo, A., . . . Kurniawati, D. A. (2023). Pet animals as reservoirs for spreading methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to human health [Review]. *Journal of Advanced Veterinary and Animal Research*, 10(1), 1-13. <https://doi.org/10.5455/javar.2023.j641>
- Kim, H., Kim, A., Kim, S. M., Nguyen, T. L., Lim, Y., Roh, H. J., . . . Cha, H. J. (2017). Genome based quantification of *Streptococcus parauberis* in multiple organs of infected olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) [Article]. *Genes & Genomics*, 39(8), 897-902. <https://doi.org/10.1007/s13258-017-0553-4>
- Kim, S., Byun, J. H., Park, H., Lee, J., Lee, H. S., Yoshida, H., . . . Takahashi, T. (2018). Molecular Epidemiological Features and Antibiotic Susceptibility Patterns of *Streptococcus dysgalactiae* subsp *equisimilis* Isolates from Korea and Japan [Article]. *Annals of Laboratory Medicine*, 38(3), 212-219. <https://doi.org/10.3343/alm.2018.38.3.212>
- Klatte, J. M., Clarridge, J. E., Bratcher, D., & Selvarangan, R. (2012). A Longitudinal Case Series Description of Meningitis Due to *Streptococcus gallolyticus* subsp *pasteurianus* in Infants [Article]. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(1), 57-60. <https://doi.org/10.1128/jcm.05635-11>
- Kmieciak, W., & Szewczyk, E. M. (2018). Are zoonotic *Staphylococcus pseudintermedius* strains a growing threat for humans? [Article]. *Folia Microbiologica*, 63(6), 743-747. <https://doi.org/10.1007/s12223-018-0615-2>
- Koh, T. H., Rahman, N. B. A., & Sessions, O. M. (2020). Comparative genomic analysis of *Streptococcus dysgalactiae* subspecies *dysgalactiae*, an occasional cause of zoonotic infection [Article]. *Pathology*, 52(2), 262-266. <https://doi.org/10.1016/j.pathol.2019.09.016>
- Koh, T. H., Sng, L. H., Yuen, S. M., Thomas, C. K., Tan, P. L., Tan, S. H., & Wong, N. S. (2009). Streptococcal Cellulitis Following Preparation of Fresh Raw Seafood [Article]. *Zoonoses and Public Health*, 56(4), 206-208. <https://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2008.01213.x>
- Kolar, S. L., Kyme, P., Tseng, C. W., Soliman, A., Kaplan, A., Liang, J. R., . . . Liu, G. Y. (2015). Group B *Streptococcus* Evades Host Immunity by Degrading Hyaluronan [Article]. *Cell Host & Microbe*, 18(6), 694-704. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.11.001>

- Kosecka-Strojek, M., Wolska, M., Zabicka, D., Sadowy, E., & Miedzobrodzki, J. (2020). Identification of Clinically Relevant Streptococcus and Enterococcus Species Based on Biochemical Methods and 16S rRNA, sodA, tuf, rpoB, and recA Gene Sequencing [Article]. *Pathogens*, 9(11), 21, Article 939. <https://doi.org/10.3390/pathogens9110939>
- Kuc-Ciepluch, D., Ciepluch, K., & Arabski, M. (2021). Gasdermin family proteins as a permeabilization factor of cell membrane in pyroptosis process [Review]. *Postepy Higieny I Medycyny Doswiadczalnej*, 75, 337-344. <https://doi.org/10.5604/01.3001.0014.8985>
- Kumar, R., Herold, J. L., Taylor, J., Xu, J., & Xu, Y. (2018). Variations among Streptococcus gallolyticus subsp gallolyticus strains in connection with colorectal cancer [Article]. *Scientific Reports*, 8, 10, Article 1514. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19941-7>
- Kutsukutsa, J., Rankhethoa, N., Pillay, J. S., De Jager, J. F., Dangor, Z., & Mahabeer, Y. (2019). Streptococcus equi subsp. zooepidemicus and "Neighbourhood syndrome" -extra-orbitocranial rhinosinusitis with reversible sudden loss of vision- a case report [Article]. *Bmc Ophthalmology*, 19, 6, Article 117. <https://doi.org/10.1186/s12886-019-1126-x>
- Lacey, K. A., Geoghegan, J. A., & McLoughlin, R. M. (2016). The Role of Staphylococcus aureus Virulence Factors in Skin Infection and Their Potential as Vaccine Antigens [Review]. *Pathogens*, 5(1), 17, Article 22. <https://doi.org/10.3390/pathogens5010022>
- Lacey, K. A., Mulcahy, M. E., Towell, A. M., Geoghegan, J. A., & McLoughlin, R. M. (2019). Clumping factor B is an important virulence factor during Staphylococcus aureus skin infection and a promising vaccine target [Article]. *Plos Pathogens*, 15(4), 20, Article e1007713. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007713>
- Lange, J., Heidenreich, K., Higelin, K., Dyck, K., Marx, V., Reichel, C., . . . Kahl, B. C. (2020). Staphylococcus aureus Pathogenicity in Cystic Fibrosis Patients- Results from an Observational Prospective Multicenter Study Concerning Virulence Genes, Phylogeny, and Gene Plasticity [Article]. *Toxins*, 12(5), 16, Article 279. <https://doi.org/10.3390/toxins12050279>
- Lannes-Costa, P. S., deOliveira, J. S. S., Santos, G. D., & Nagao, P. E. (2021). A current review of pathogenicity determinants of Streptococcus sp [Review]. *Journal of Applied Microbiology*, 131(4), 1600-1620. <https://doi.org/10.1111/jam.15090>
- Launay, A., Wu, C. J., Dulanto Chiang, A., Youn, J. H., Khil, P. P., & Dekker, J. P. (2021). In vivo evolution of an emerging zoonotic bacterial pathogen in an immunocompromised human host [Article]. *Nature Communications*, 12(1), 12, Article 4495. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-24668-7>
- Leitner, E., Zollner-Schwetz, I., Zarfel, G., Masoud-Landgraf, L., Gehrler, M., Wagner-Eibel, U., . . . Feierl, G. (2015). Prevalence of emm types and antimicrobial susceptibility of Streptococcus dysgalactiae subsp equisimilis in Austria [Article]. *International Journal of Medical Microbiology*, 305(8), 918-924. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2015.10.001>
- Li, Y., Chen, X. C., Zhang, Z. J., Wang, L. J., Wang, J. R., Zeng, J., . . . Lu, B. H. (2019). Microbiological and clinical characteristics of Streptococcus gallolyticus subsp. pasteurianus infection in China [Article]. *Bmc Infectious Diseases*, 19(1), 11, Article 791. <https://doi.org/10.1186/s12879-019-4413-5>

- Lin, Q. Y., Ye, X., Yang, B., Fang, X. E., Chen, H., Weng, W. H., & Kong, J. L. (2019). Real-time fluorescence loop-mediated isothermal amplification assay for rapid and sensitive detection of *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* associated with colorectal cancer [Article]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *411*(26), 6877-6887. <https://doi.org/10.1007/s00216-019-02059-8>
- Lizano, S., & Johnston, K. H. (2005). Structural diversity of streptokinase and activation of human plasminogen [Article]. *Infection and Immunity*, *73*(7), 4451-4453. <https://doi.org/10.1128/iai.73.7.4451-4453.2005>
- Lizano, S., Luo, F., & Bessen, D. E. (2007). Role of streptococcal T antigens in superficial skin infection [Article]. *Journal of Bacteriology*, *189*(4), 1426-1434. <https://doi.org/10.1128/jb.01179-06>
- Lo, H. H., & Cheng, W. S. (2015). Distribution of virulence factors and association with emm polymorphism or isolation site among beta-hemolytic group G *Streptococcus dysgalactiae* subspecies *equisimilis* [Article]. *Apmis*, *123*(1), 45-52. <https://doi.org/10.1111/apm.12305>
- Loffler, B., Hussain, M., Grundmeier, M., Bruck, M., Holzinger, D., Varga, G., . . . Peters, G. (2010). Staphylococcus aureus Panton-Valentine Leukocidin Is a Very Potent Cytotoxic Factor for Human Neutrophils [Article]. *Plos Pathogens*, *6*(1), 12, Article e1000715. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000715>
- Lothar, S. A., Demczuk, W., Martin, I., Mulvey, M., Dufault, B., Lagace-Wiens, P., & Keynan, Y. (2017). Clonal Clusters and Virulence Factors of Group C and G *Streptococcus* Causing Severe Infections, Manitoba, Canada, 2012-2014 [Article]. *Emerging Infectious Diseases*, *23*(7), 1092-1101. <https://doi.org/10.3201/eid2307.161259>
- Loures, R. A., Pereira, U. D., de Carvalho-Castro, G. D., Mian, G. F., Custodio, D. A. D., da Silva, J. R., & da Costa, G. M. (2017). Genetic diversity and virulence genes in *Streptococcus uberis* strains isolated from bovine mastitis [Article]. *Semina-Ciencias Agrarias*, *38*(4), 2595-2605. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2017v38n4Supl1p2595>
- Luo, X., Fu, X. Z., Liao, G. L., Chang, O. Q., Huang, Z. B., & Li, N. Q. (2017). Isolation, pathogenicity and characterization of a novel bacterial pathogen *Streptococcus uberis* from diseased mandarin fish *Siniperca chuatsi* [Article]. *Microbial Pathogenesis*, *107*, 380-389. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.03.049>
- Ma, M. H., Wang, S. Y., Zhu, X. C., Li, X. C., Bao, Y. L., Chen, X., & Wu, Z. F. (2023). The Identification of *Streptococcus pasteurianus* Obtained from Six Regions in China by Multiplex PCR Assay and the Characteristics of Pathogenicity and Antimicrobial Resistance of This Zoonotic Pathogen [Article]. *Pathogens*, *12*(4), 12, Article 615. <https://doi.org/10.3390/pathogens12040615>
- Ma, X. M., Kikuta, H., Ishiguro, N., Yoshioka, M., Ebihara, T., Murai, T., . . . Kobayashi, K. (2002). Association of the prtF1 gene (encoding fibronectin-binding protein F1) and the sic gene (encoding the streptococcal inhibitor of complement) with emm types of group A streptococci isolated from Japanese children with pharyngitis [Article]. *Journal of Clinical Microbiology*, *40*(10), 3835-3837. <https://doi.org/10.1128/jcm.40.10.3835-3837.2002>

- Maali, Y., Badiou, C., Martins-Simoes, P., Hodille, E., Bes, M., Vandenesch, F., . . . Trouillet-Assant, S. (2018). Understanding the Virulence of *Staphylococcus pseudintermedius*: A Major Role of Pore-Forming Toxins [Article]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 8, 10, Article 221. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00221>
- Maciejewska, A., Lugowski, C., & Lukasiewicz, J. (2022). First Report on the *Streptococcus gallolyticus* (S. bovis Biotype I) DSM 13808 Exopolysaccharide Structure [Article]. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(19), 11, Article 11797. <https://doi.org/10.3390/ijms231911797>
- Magleby, R., Bemis, D. A., Kim, D., Carroll, K. C., Castanheira, M., Kania, S. A., . . . Westblade, L. F. (2019). First reported human isolation of *Staphylococcus delphini* [Article]. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 94(3), 274-276. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2019.01.014>
- Malkin, J., Kimmitt, P. T., Ou, H. Y., Bhasker, P. S. S., Khare, M., Deng, Z. X., . . . Rajakumar, K. (2008). Identification of *Streptococcus gallolyticus* subsp macedonicus as the Etiological Agent in a Case of Culture-Negative Multivalve Infective Endocarditis by 16S rDNA PCR Analysis of Resected Valvular Tissue [Article]. *Journal of Heart Valve Disease*, 17(5), 589-592.
- Manyahi, J., Moyo, S. J., Langeland, N., & Blomberg, B. (2023). Genetic determinants of macrolide and tetracycline resistance in penicillin non-susceptible *Streptococcus pneumoniae* isolates from people living with HIV in Dar es Salaam, Tanzania [Article]. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 22(1), 7, Article 16. <https://doi.org/10.1186/s12941-023-00565-3>
- Marchandin, H., Jumas-Bilak, E., Boumzebra, A., Vidal, D., Jonquet, O., & Corne, P. (2007). Fatal *Streptococcus equi* subsp ruminatorum infection in a man [Letter]. *Emerging Infectious Diseases*, 13(12), 1964-1966. <https://doi.org/10.3201/eid1312.070109>
- Martins, L., Goncalves, J. L., Leite, R. F., Tomazi, T., Rall, V. L. M., & Santos, M. V. (2021). Association between antimicrobial use and antimicrobial resistance of *Streptococcus uberis* causing clinical mastitis [Article]. *Journal of Dairy Science*, 104(11), 12030-12041. <https://doi.org/10.3168/jds.2021-20177>
- Matesanz, M., Rubal, D., Iniguez, I., Rabunal, R., Garcia-Garrote, F., Coira, A., . . . Corredoira, J. (2015). Is *Streptococcus bovis* a urinary pathogen? [Article]. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 34(4), 719-725. <https://doi.org/10.1007/s10096-014-2273-x>
- Matic, I. (1995). THE CONTROL OF INTERSPECIES GENETIC EXCHANGES AND GENETIC-VARIABILITY IN BACTERIA [Review]. *Bulletin De L Institut Pasteur*, 93(3), 187-219. [https://doi.org/10.1016/0020-2452\(96\)81489-8](https://doi.org/10.1016/0020-2452(96)81489-8)
- Matsubara, K., Takegawa, H., Sakizono, K., Nomoto, R., Yamamoto, G., & Osawa, R. (2015). Transient Bacteremia Due to *Streptococcus gallolyticus* Subsp pasteurianus in a 3-Year-Old Infant [Article]. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 68(3), 251-253. <https://doi.org/10.7883/yoken.JJID.2014.423>
- McCormick, J. K., Yarwood, J. M., & Schlievert, P. M. (2001). Toxic shock syndrome and bacterial superantigens: An update [Review]. *Annual Review of Microbiology*, 55, 77-104. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.55.1.77>
- McDougall, S., Clausen, L., Ha, H. J., Gibson, I., Bryan, M., Hadjirin, N., . . . Holmes, M. A. (2020). Mechanisms of beta-lactam resistance of *Streptococcus uberis*

- isolated from bovine mastitis cases [Article]. *Veterinary Microbiology*, 242, 8, Article 108592. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2020.108592>
- McDougall, S., Hussein, H., & Petrovski, K. (2014). Antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis* and *Streptococcus dysgalactiae* from dairy cows with mastitis [Article]. *New Zealand Veterinary Journal*, 62(2), 68-76. <https://doi.org/10.1080/00480169.2013.843135>
- McIver, K. S., Subbarao, S., Kellner, E. M., Heath, A. S., & Scott, J. R. (1996). Identification of *isp*, a locus encoding an immunogenic secreted protein conserved among group a streptococci [Article]. *Infection and Immunity*, 64(7), 2548-2555. <https://doi.org/10.1128/iai.64.7.2548-2555.1996>
- McKenna, S., Huse, K. K., Giblin, S., Pearson, M., Al Shibar, M. S. M., Sriskandan, S., . . . Pease, J. E. (2022). The Role of Streptococcal Cell-Envelope Proteases in Bacterial Evasion of the Innate Immune System [Review]. *Journal of Innate Immunity*, 14(2), 69-88. <https://doi.org/10.1159/000516956>
- McMillan, D. J., Bessen, D. E., Pinho, M., Ford, C., Hall, G. S., Melo-Cristino, J., & Ramirez, M. (2010). Population Genetics of *Streptococcus dysgalactiae* Subspecies *equisimilis* Reveals Widely Dispersed Clones and Extensive Recombination [Article]. *Plos One*, 5(7), 11, Article e11741. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011741>
- Melter, O., Svec, P., Tkadlec, J., Doskar, J., Kinska, H., & Pantucek, R. (2017). Characterisation of methicillin-susceptible *Staphylococcus pseudintermedius* isolates from canine infections and determination of virulence factors using multiplex PCR [Article]. *Veterinarni Medicina*, 62(2), 81-89. <https://doi.org/10.17221/105/2016-vetmed>
- Meriglier, E., Michaud, A., Plouzeau, C., Raud-Raynier, P., Burucoa, C., & Roblot, F. (2018). A fatal case of *Streptococcus uberis* endocarditis on cardiovascular implantable electronic device [Letter]. *Medecine Et Maladies Infectieuses*, 48(8), 549-551. <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2018.07.003>
- Meroni, G., Filipe, J. F. S., Drago, L., & Martino, P. A. (2019). Investigation on Antibiotic-Resistance, Biofilm Formation and Virulence Factors in Multi Drug Resistant and Non Multi Drug Resistant *Staphylococcus pseudintermedius* [Article]. *Microorganisms*, 7(12), 11, Article 702. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7120702>
- Meyer, A., Messer, L., De Briel, D., & Moreau, P. (2011). Second reported case of human infection with *Streptococcus equi* subsp *ruminatorum* [Article]. *Joint Bone Spine*, 78(3), 303-305. <https://doi.org/10.1016/j.jbspin.2010.12.002>
- Mills, J. O., & Ghosh, P. (2021). Nonimmune antibody interactions of Group A *Streptococcus* M and M-like proteins [Review]. *Plos Pathogens*, 17(2), 15, Article e1009248. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009248>
- Mioni, M. D. R., Castro, F. F. C., Moreno, L. Z., Apolinario, C. M., Belaz, L. D., Peres, M. G., . . . Megid, J. (2018). Septicemia due to *Streptococcus dysgalactiae* subspecies *dysgalactiae* in vampire bats (*Desmodus rotundus*) [Article]. *Scientific Reports*, 8, 6. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28061-1>
- Misic, M., Arsovic, A., Cukic, J., Rosic, M. I., Tosic-Pajic, J., Manojlovic, N., . . . Baskic, D. (2018). The prevalence of resistance to macrolides and lincosamides among community- and hospital-acquired staphylococci and streptococci isolates in southeast Serbia [Article]. *Srpski Arhiv Za Celokupno Lekarstvo*, 146(7-8), 384-390. <https://doi.org/10.2298/sarh170407197m>

- Miszczak, M., Lachowska, S., & Bierowiec, K. (2021). *Staphylococcus pseudintermedius*: Is it a real threat to human health? [Article]. *Postępy Higieny I Medycyny Doswiadczałnej*, 75(1), 980-986. <https://doi.org/10.2478/ahem-2021-0029>
- Molloy, E. M., Cotter, P. D., Hill, C., Mitchell, D. A., & Ross, R. P. (2011). Streptolysin S-like virulence factors: the continuing saga [Review]. *Nature Reviews Microbiology*, 9(9), 670-681. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2624>
- Morais, C., Costa, S. S., Leal, M., Ramos, B., Andrade, M., Ferreira, C., . . . Couto, I. (2023). Genetic diversity and antimicrobial resistance profiles of *Staphylococcus pseudintermedius* associated with skin and soft-tissue infections in companion animals in Lisbon, Portugal [Article]. *Frontiers in Microbiology*, 14, 15, Article 1167834. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1167834>
- Moses, I. B., Santos, F. F., & Gales, A. C. (2023). Human Colonization and Infection by *Staphylococcus pseudintermedius*: An Emerging and Underestimated Zoonotic Pathogen [Review]. *Microorganisms*, 11(3), 19, Article 581. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11030581>
- Murray, A. K., Lee, J., Bendall, R., Zhang, L. H., Sunde, M., Slettemeas, J. S., . . . Vos, M. (2018). *Staphylococcus cornubiensis* sp nov., a member of the *Staphylococcus intermedius* Group (SIG) [Article]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 68(11), 3404-3408. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002992>
- Nathan, B., Pillai, V., Ayyan, S. M., Ss, A., & Raju, K. (2021). *Streptococcus dysgalactiae* Subspecies *dysgalactiae* Infection Presenting With Septic Shock [Article]. *Cureus*, 13(1), 5, Article e12465. <https://doi.org/10.7759/cureus.12465>
- Nguyen, V. A., Ogura, K., Matsue, M., Takemoto, N., Mukai, K., Nakajima, Y., . . . Ichimura, H. (2020). Novel Hyaluronate Lyase Involved in Pathogenicity of *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* [Article]. *Frontiers in Microbiology*, 11, 12, Article 552418. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.552418>
- Nitzsche, R., Kohler, J., Kreikemeyer, B., & Oehmcke-Hecht, S. (2016). *Streptococcus pyogenes* Escapes Killing from Extracellular Histones through Plasminogen Binding and Activation by Streptokinase [Article]. *Journal of Innate Immunity*, 8(6), 589-600. <https://doi.org/10.1159/000448039>
- Nitzsche, R., Rosenheinrich, M., Kreikemeyer, B., & Oehmcke-Hecht, S. (2015). *Streptococcus pyogenes* Triggers Activation of the Human Contact System by Streptokinase [Article]. *Infection and Immunity*, 83(8), 3035-3042. <https://doi.org/10.1128/iai.00180-15>
- Nozawa, T., Iibushi, J., Toh, H., Minowa-Nozawa, A., Murase, K., Aikawa, C., & Nakagawa, I. (2021). Intracellular Group A *Streptococcus* Induces Golgi Fragmentation To Impair Host Defenses through Streptolysin O and NAD-Glycohydrolase [Article]. *Mbio*, 12(1), 15, Article e01974-20. <https://doi.org/10.1128/mBio.01974-20>
- Obszanska, K., Kern-Zdanowicz, I., & Sitkiewicz, I. (2014). Virulence mechanisms factors and pathogenic of beta-hemolytic streptococci [Article]. *Postępy Mikrobiologii*, 53(2), 101-111.
- Ogawa, T., Terao, Y., Okuni, H., Ninomiya, K., Sakata, H., Ikebe, K., . . . Kawabata, S. (2011). Biofilm formation or internalization into epithelial cells enable

- Streptococcus pyogenes to evade antibiotic eradication in patients with pharyngitis [Article]. *Microbial Pathogenesis*, 51(1-2), 58-68. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2011.03.009>
- Oh, S. I., Kim, J. W., Jung, J. Y., Chae, M., Lee, Y. R., Kim, J. H., . . . Kim, H. Y. (2018). Pathologic and molecular characterization of Streptococcus dysgalactiae subsp equisimilis infection in neonatal piglets [Article]. *Journal of Veterinary Science*, 19(2), 313-317. <https://doi.org/10.4142/jvs.2018.19.2.313>
- Oliver, S. P., Pighetti, G. M., Almeida, R. A., & Fuquay, J. W. (2011). Mastitis Pathogens | Environmental Pathogens. In *Encyclopedia of Dairy Sciences (Second Edition)* (pp. 415-421). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374407-4.00301-0>
- Pagnossin, D., Smith, A., Oravcova, K., & Weir, W. (2022). Streptococcus canis, the underdog of the genus [Article]. *Veterinary Microbiology*, 273, 9, Article 109524. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2022.109524>
- Patrick, M. E., Gilbert, M. J., Blaser, M. J., Tauxe, R. V., Wagenaar, J. A., & Fitzgerald, C. (2013). Human Infections with New Subspecies of Campylobacter fetus [Article]. *Emerging Infectious Diseases*, 19(10), 1678-1680. <https://doi.org/10.3201/eid1910.130883>
- Peer, M. A., Nasir, R. A., Kakru, D. K., Fomda, B. A., Bashir, G., & Sheikh, I. A. (2011). Sepsis due to linezolid resistant Staphylococcus cohnii and Staphylococcus kloosii: First reports of linezolid resistance in coagulase negative staphylococci from India [Article]. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 29(1), 60-62. <https://doi.org/10.4103/0255-0857.76527>
- Pena, A., Abarca, K., Weitzel, T., Gallegos, J., Cerda, J., Garcia, P., & Lopez, J. (2016). One Health in Practice: A Pilot Project for Integrated Care of Zoonotic Infections in Immunocompromised Children and Their Pets in Chile [Article]. *Zoonoses and Public Health*, 63(5), 403-409. <https://doi.org/10.1111/zph.12241>
- Phumthanakorn, N., Chanchaithong, P., & Prapasarakul, N. (2017). Development of a set of multiplex PCRs for detection of genes encoding cell wall-associated proteins in Staphylococcus pseudintermedius isolates from dogs, humans and the environment [Article]. *Journal of Microbiological Methods*, 142, 90-95. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2017.09.003>
- Piechota, M., Kot, B., Frankowska-Maciejewska, A., Gruzewska, A., & Wozniak-Kosek, A. (2018). Biofilm Formation by Methicillin-Resistant and Methicillin-Sensitive Staphylococcus aureus Strains from Hospitalized Patients in Poland [Article]. *Biomed Research International*, 2018, 7, Article 4657396. <https://doi.org/10.1155/2018/4657396>
- Pitchenin, L. C., Brandao, L. N. S., Rosa, J. M. A., Kagueyama, F. C., Alves, A. D., Rocha, I. S. M., . . . Dutra, V. (2017). Occurrence of toxin genes in Staphylococcus pseudintermedius from diseased dogs and other domestic and wild species [Article]. *Journal of Infection in Developing Countries*, 11(12), 957-961. <https://doi.org/10.3855/jidc.8261>
- Plainvert, C., Martin, C., Loubinoux, J., Touak, G., Dmytruk, N., Collobert, G., . . . Poyart, C. (2015). Highly virulent M1 Streptococcus pyogenes isolates resistant to clindamycin [Article]. *Medecine Et Maladies Infectieuses*, 45(11-12), 470-474. <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2015.10.008>

- Pompilio, A., Di Bonaventura, G., & Gherardi, G. (2019). An Overview on Streptococcus bovis/Streptococcus equinus Complex Isolates: Identification to the Species/Subspecies Level and Antibiotic Resistance [Review]. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(3), 15, Article 480. <https://doi.org/10.3390/ijms20030480>
- Prezioso, S., Laus, F., Tejada, A. R., Valente, C., & Cuteri, V. (2010). Detection of Streptococcus dysgalactiae subsp equisimilis in equine nasopharyngeal swabs by PCR [Article]. *Journal of Veterinary Science*, 11(1), 67-72. <https://doi.org/10.4142/jvs.2010.11.1.67>
- Rabaa, M. A., Tue, N. T., Phuc, T. M., Carrique-Mas, J., Saylor, K., Cotten, M., . . . Baker, S. (2015). The Vietnam Initiative on Zoonotic Infections (VIZIONS): A Strategic Approach to Studying Emerging Zoonotic Infectious Diseases [Review]. *Ecohealth*, 12(4), 726-735. <https://doi.org/10.1007/s10393-015-1061-0>
- Raemy, A., Meylan, M., Casati, S., Gaia, V., Berchtold, B., Boss, R., . . . Graber, H. U. (2013). Phenotypic and genotypic identification of streptococci and related bacteria isolated from bovine intramammary infections [Article]. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 55, 9, Article 53. <https://doi.org/10.1186/1751-0147-55-53>
- Rahman, M. T., Sobur, M. A., Islam, M. S., Ievy, S., Hossain, M. J., El Zowalaty, M. E., . . . Ashour, H. M. (2020). Zoonotic Diseases: Etiology, Impact, and Control [Review]. *Microorganisms*, 8(9), 34, Article 1405. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8091405>
- Raissy, M., Sarshoughi, M., & Moumeni, M. (2016). Molecular identification of some causative agents of warm-water streptococcosis by M-PCR in cultured rainbow trout, Chaharmahal - Bakhtiari Province, Iran [Article]. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 15(2), 836-845.
- Ramachandran, V., McArthur, J. D., Behm, C. E., Gutzeit, C., Dowton, M., Fagan, P. K., . . . Walker, M. J. (2004). Two distinct genotypes of prtF2, encoding a fibronectin binding protein, and evolution of the gene family in Streptococcus pyogenes [Article]. *Journal of Bacteriology*, 186(22), 7601-7609. <https://doi.org/10.1128/jb.186.22.7601-7609.2004>
- Rantala, S. (2014). Streptococcus dysgalactiae subsp equisimilis bacteremia: an emerging infection [Review]. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 33(8), 1303-1310. <https://doi.org/10.1007/s10096-014-2092-0>
- Rato, M. G., Nerlich, A., Bergmann, R., Bexiga, R., Nunes, S. F., Vilela, C. L., . . . Chhatwal, G. S. (2011). Virulence Gene Pool Detected in Bovine Group C Streptococcus dysgalactiae subsp dysgalactiae Isolates by Use of a Group A S. pyogenes Virulence Microarray [Article]. *Journal of Clinical Microbiology*, 49(7), 2470-2479. <https://doi.org/10.1128/jcm.00008-11>
- Reglinski, M., Sriskandan, S., & Turner, C. E. (2019). Identification of two new core chromosome-encoded superantigens in Streptococcus pyogenes; speQ and speR [Article]. *Journal of Infection*, 78(5), 358-363. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2019.02.005>
- Richards, V. P., Lang, P., Bitar, P. D. P., Lefebure, T., Schukken, Y. H., Zadoks, R. N., & Stanhope, M. J. (2011). Comparative genomics and the role of lateral gene transfer in the evolution of bovine adapted Streptococcus agalactiae

- [Article]. *Infection Genetics and Evolution*, 11(6), 1263-1275. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.04.019>
- Rizzo, V., Di Caprio, G., Carannante, N., Rescigno, C., Rossi, M., Bernardo, M., . . . Tascini, C. (2019). Bacteremia, without Endocarditis, due to *Streptococcus gallolyticus* Subspecies *gallolyticus* in an Infant with Tetralogy of Fallot [Article]. *Journal of Pediatric Infectious Diseases*, 14(4), 201-203. <https://doi.org/10.1055/s-0037-1608701>
- Rodriguez-Munoz, L., Garcia-Galvan, O., Gonzalez-Soto, M. A., Echaniz-Aviles, G., & Solorzano-Santos, F. (2019). Toxic shock syndrome caused by *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* in a Mexican preschool patient [Article]. *Boletin Medico Del Hospital Infantil De Mexico*, 76(5), 237-240. <https://doi.org/10.24875/bmhim.19000095>
- Rajo-Bezares, B., Toca, L., Azcona-Gutierrez, J. M., Ortega-Unanue, N., Toledano, P., & Saenz, Y. (2021). *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* from invasive and non-invasive infections in Spain: combining epidemiology, molecular characterization, and genetic diversity [Article]. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 40(5), 1013-1021. <https://doi.org/10.1007/s10096-020-04119-9>
- Ruzauskas, M., Couto, N., Pavilonis, A., Klimiene, I., Siugzdiniene, R., Virgailis, M., . . . Pomba, C. (2016). Characterization of *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from diseased dogs in Lithuania [Article]. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 19(1), 7-14. <https://doi.org/10.1515/pjvs-2016-0002>
- Sayers, E. W., Cavanaugh, M., Clark, K., Pruitt, K. D., Sherry, S. T., Yankie, L., & Karsch-Mizrachi, I. (2022). GenBank 2023 update [Article; Early Access]. *Nucleic Acids Research*, 4. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac1012>
- Schmitz, M., Roux, X., Huttner, B., & Pugin, J. (2018). Streptococcal toxic shock syndrome in the intensive care unit [Review]. *Annals of Intensive Care*, 8, 10, Article 88. <https://doi.org/10.1186/s13613-018-0438-y>
- Schroeder, B., Boyle, M. D. P., Sheerin, B. R., Asbury, A. C., & Lottenberg, R. (1999). Species specificity of plasminogen activation and acquisition of surface-associated proteolytic activity by group C streptococci grown in plasma [Article]. *Infection and Immunity*, 67(12), 6487-6495.
- Sewid, A. H., Hassan, M. N., Ammar, A. M., Bemis, D. A., & Kania, S. A. (2018). Identification, Cloning, and Characterization of *Staphylococcus pseudintermedius* Coagulase [Article]. *Infection and Immunity*, 86(8), 11, Article e00027-18. <https://doi.org/10.1128/iai.00027-18>
- Shapiro, B. J., Leducq, J. B., & Mallet, J. (2016). What Is Speciation? [Review]. *Plos Genetics*, 12(3), 14, Article e1005860. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005860>
- Shelyakin, P. V., Bochkareva, O. O., Karan, A. A., & Gelfand, M. S. (2019). Micro-evolution of three *Streptococcus* species: selection, antigenic variation, and horizontal gene inflow [Article]. *Bmc Evolutionary Biology*, 19, 15, Article 83. <https://doi.org/10.1186/s12862-019-1403-6>
- Shen, J. R., Wu, X. H., Yang, Y. Y., Lv, Y. N., Li, X. P., Ding, X. Z., . . . Li, H. S. (2021). Antimicrobial Resistance and Virulence Factor of *Streptococcus dysgalactiae* Isolated from Clinical Bovine Mastitis Cases in Northwest China [Article]. *Infection and Drug Resistance*, 14, 3519-3530. <https://doi.org/10.2147/idr.s327924>

- Shi, H. F., Zhou, M. X., Zhang, Z. T., Hu, Y., Song, S. Y., Hui, R. Q., . . . Yao, L. G. (2023). Molecular epidemiology, drug resistance, and virulence gene analysis of *Streptococcus agalactiae* isolates from dairy goats in backyard farms in China [Article]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12, 13, Article 1049167. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.1049167>
- Shimomura, Y., Okumura, K., Murayama, S. Y., Yagi, J., Ubukata, K., Kirikae, T., & Miyoshi-Akiyama, T. (2011). Complete genome sequencing and analysis of a Lancefield group G *Streptococcus dysgalactiae* subsp *equisimilis* strain causing streptococcal toxic shock syndrome (STSS) [Article]. *Bmc Genomics*, 12, 17, Article 17. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-17>
- Shumba, P., Shambat, S. M., & Siemens, N. (2019). The Role of Streptococcal and Staphylococcal Exotoxins and Proteases in Human Necrotizing Soft Tissue Infections [Review]. *Toxins*, 11(6), 29. <https://doi.org/10.3390/toxins11060332>
- Siemens, N., & Lutticken, R. (2021). *Streptococcus pyogenes* ("Group A Streptococcus"), a Highly Adapted Human Pathogen-Potential Implications of Its Virulence Regulation for Epidemiology and Disease Management [Review]. *Pathogens*, 10(6), 17, Article 776. <https://doi.org/10.3390/pathogens10060776>
- Silva, L. G., Genteluci, G. L., de Mattos, M. C., Glatthardt, T., Figueiredo, A. M. S., & Ferreira-Carvalho, B. T. (2015). Group C *Streptococcus dysgalactiae* subsp *equisimilis* in south-east Brazil: genetic diversity, resistance profile and the first report of human and equine isolates belonging to the same multilocus sequence typing lineage [Article]. *Journal of Medical Microbiology*, 64, 551-558. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000052>
- Silva, V., Oliveira, A., Manageiro, V., Canica, M., Contente, D., Capita, R., . . . Poeta, P. (2021). Clonal Diversity and Antimicrobial Resistance of Methicillin-Resistant *Staphylococcus pseudintermedius* Isolated from Canine Pyoderma [Article]. *Microorganisms*, 9(3), 10, Article 482. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9030482>
- Somayaji, R., Rubin, J. E., Priyantha, M. A. R., & Church, D. (2016). Exploring *Staphylococcus pseudintermedius*: an emerging zoonotic pathogen? [Editorial Material]. *Future Microbiology*, 11(11), 1371-1374. <https://doi.org/10.2217/fmb-2016-0137>
- Speziale, P., Arciola, C. R., & Pietrocola, G. (2019). Fibronectin and Its Role in Human Infective Diseases [Review]. *Cells*, 8(12), 24, Article 1516. <https://doi.org/10.3390/cells8121516>
- Spickler, A. R. (2020). Zoonotic Streptococcosis. In *Last Updated: September 2020*. Centers for Disease Control and Prevention (CDC): The Center for Food Security & Public Health.
- Srednik, M. E., Perea, C. A., Giacoboni, G. I., Hicks, J. A., & Schlater, L. K. (2023). First report of *Staphylococcus pseudintermedius* ST71-SCCmec III and ST45-psi SCCmec(57395) from canine pyoderma in Argentina [Article]. *Bmc Research Notes*, 16(1), 6, Article 19. <https://doi.org/10.1186/s13104-023-06285-3>
- Stempelova, L., Kubasova, I., Bujnakova, D., Kacirova, J., Farbakova, J., Madar, M., . . . Stropfova, V. (2022). Distribution and Characterization of Staphylococci Isolated From Healthy Canine Skin [Article]. *Topics in Companion Animal Medicine*, 49, 7, Article 100665. <https://doi.org/10.1016/j.tcam.2022.100665>

- Sunagawa, K., Shirafuji, T., Sun, G. D., Arai, R., Azuma, H., Miyoshi-Akiyama, T., & Katano, H. (2022). Intra-familial transmission of *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* (SDSE): A first case report and review of the literature [Review]. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 28(6), 819-822. <https://doi.org/10.1016/j.jiac.2022.01.017>
- Szemraj, M., Lisiecki, P., Glajzner, P., & Szewczyk, E. M. (2023). Vancomycin heteroresistance among methicillin-resistant clinical isolates *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. simulans*, and *S. warneri* [Article]. *Brazilian Journal of Microbiology*, 54(1), 159-167. <https://doi.org/10.1007/s42770-022-00870-7>
- Takahashi, T., Fujita, T., Shibayama, A., Tsuyuki, Y., & Yoshida, H. (2017). Prevalence of Complement-Mediated Cell Lysis-like Gene (*sicG*) in *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* Isolates From Japan (2014-2016) [Article]. *Annals of Laboratory Medicine*, 37(4), 297-304. <https://doi.org/10.3343/alm.2017.37.4.297>
- Takahashi, T., Ubukata, K., & Watanabe, H. (2011). Invasive infection caused by *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*: characteristics of strains and clinical features [Review]. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 17(1), 1-10. <https://doi.org/10.1007/s10156-010-0084-2>
- Tanaka, M., Kinoshita-Daitoku, R., Kiga, K., Sanada, T., Zhu, B., Okano, T., . . . Mimuro, H. (2020). Group A *Streptococcus* establishes pharynx infection by degrading the deoxyribonucleic acid of neutrophil extracellular traps [Article]. *Scientific Reports*, 10(1), 11, Article 3251. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-60306-w>
- Torpiano, P., Nestorova, N., & Vella, C. (2020). *Streptococcus equi* subsp. *equi* meningitis, septicemia and subdural empyema in a child [Article]. *Idcases*, 21, 3, Article e00808. <https://doi.org/10.1016/j.idcr.2020.e00808>
- Torres, M. C., Moni, C. A., Menetrier, L. D., Breyer, G. M., & Siqueira, F. M. (2022). *Streptococcus* spp. in Equines - Infection and Antimicrobial Susceptibility Profiles [Article]. *Acta Scientiae Veterinariae*, 50, 5, Article 1882. <https://doi.org/10.22456/1679-9216.125109>
- Torres-Corral, Y., & Santos, Y. (2020). Comparative genomics of *Streptococcus parauberis*: new target for molecular identification of serotype III [Article]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(14), 6211-6222. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10683-z>
- Traverso, F., Blanco, A., Villalon, P., Beratz, N., Nieto, J. A. S., Lopardo, H., & Natl Collaborative Grp Study, S. (2016). Molecular characterization of invasive *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*. Multicenter study:Argentina 2011-2012 [Article]. *Revista Argentina De Microbiologia*, 48(4), 279-289. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2016.07.001>
- Trotta, A., Sposato, A., Marinaro, M., Zizzo, N., Passantino, G., Parisi, A., . . . Corrente, M. (2019). Neurological symptoms and mortality associated with *Streptococcus gallolyticus* subsp. *pasteurianus* in calves [Article]. *Veterinary Microbiology*, 236, 5, Article 108369. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2019.07.021>
- Turner, C. E., Bubba, L., & Efstratiou, A. (2019). Pathogenicity Factors in Group C and G *Streptococci* [Article]. *Microbiology Spectrum*, 7(3), 13, Article Gpp3-0020-2018. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0020-2018>
- Valentiny, C., Dirschmid, H., & Lhotta, K. (2015). *Streptococcus uberis* and *Staphylococcus aureus* forefoot and blood stream co-infection in a

- haemodialysis patient: a case report [Article]. *Bmc Nephrology*, 16, 4, Article 73. <https://doi.org/10.1186/s12882-015-0069-6>
- van der Mee-Marquet, N. L., Benejat, L., Diene, S. M., Lemaïgnen, A., Gaia, N., Smet, A., . . . Francois, P. (2017). A Potential New Human Pathogen Belonging to Helicobacter Genus, Identified in a Bloodstream Infection [Article]. *Frontiers in Microbiology*, 8, 8, Article 2533. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02533>
- Vandamme, P., Pot, B., Falsen, E., Kersters, K., & Devriese, L. A. (1996). Taxonomic study of Lancefield streptococcal groups C, G, and L (*Streptococcus dysgalactiae*) and proposal of *S-dysgalactiae* subsp. *equisimilis* subsp. nov [Article]. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 46(3), 774-781. <https://doi.org/10.1099/00207713-46-3-774>
- Vannice, K. S., Ricaldi, J., Nanduri, S., Fang, F. C., Lynch, J. B., Bryson-Cahn, C., . . . Beall, B. (2020). *Streptococcus pyogenes* pbp2x Mutation Confers Reduced Susceptibility to beta-Lactam Antibiotics [Article]. *Clinical Infectious Diseases*, 71(1), 201-204. <https://doi.org/10.1093/cid/ciz1000>
- Verhamme, I. M., Panizzi, P. R., & Bock, P. E. (2015). Pathogen activators of plasminogen [Review]. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 13, S106-S114. <https://doi.org/10.1111/jth.12939>
- Viau, R., Hujer, A. M., Hujer, K. M., Bonomo, R. A., & Jump, R. L. P. (2015). Are *Staphylococcus intermedius* Infections in Humans Cases of Mistaken Identity? A Case Series and Literature Review [Article]. *Open Forum Infectious Diseases*, 2(3), 4. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofv110>
- Vieira, V. V., Teixeira, L. M., Zahner, V., Momen, H., Facklam, R. R., Steigerwalt, A. G., . . . Castro, A. C. D. (1998). Genetic relationships among the different phenotypes of *Streptococcus dysgalactiae* strains [Article]. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 48, 1231-1243. <https://doi.org/10.1099/00207713-48-4-1231>
- Villalon, P., Barcena, M., Medina-Pascual, M. J., Garrido, N., Pino-Rosa, S., Carrasco, G., & Valdezate, S. (2023). National Surveillance of Tetracycline, Erythromycin, and Clindamycin Resistance in Invasive *Streptococcus pyogenes*: A Retrospective Study of the Situation in Spain, 2007-2020 [Article]. *Antibiotics-Basel*, 12(1), 11, Article 99. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12010099>
- Wang, X. H., Zhang, X. X., & Zong, Z. Y. (2016). Genome sequence and virulence factors of a group G *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* strain with a new element carrying *erm(B)* [Article]. *Scientific Reports*, 6, 6, Article 20389. <https://doi.org/10.1038/srep20389>
- Wang, Z. H., Guo, L., Li, J., Li, J. J., Cui, L. Y., Dong, J. S., . . . Wang, H. (2022). Antibiotic resistance, biofilm formation, and virulence factors of isolates of *staphylococcus pseudintermedius* from healthy dogs and dogs with keratitis [Article]. *Frontiers in Veterinary Science*, 9, 12, Article 903633. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.903633>
- Wasniewska-Wlodarczyk, A., Pepas, R., Janowicz, R., & Konopka, W. (2022). *Streptococcus equi* subsp. *equi* in Retropharyngeal Abscess: Case Report and Review of Literature [Review]. *Microorganisms*, 10(10), 6, Article 2032. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10102032>
- Watanabe, S., Takemoto, N., Ogura, K., & Miyoshi-Akiyama, T. (2016). Severe invasive streptococcal infection by *Streptococcus pyogenes* and *Streptococcus*

- dysgalactiae subsp equisimilis [Review]. *Microbiology and Immunology*, 60(1), 1-9. <https://doi.org/10.1111/1348-0421.12334>
- Werner, C., Sauerwald, C., Sundrum, A., El-Sayed, A., & Zschock, M. (2018). Genotyping of *Streptococcus uberis* isolates in healing process of bovine clinical mastitis [Article]. *International Journal of Veterinary Science and Medicine*, 6(2), 274-278. <https://doi.org/10.1016/j.ijvsm.2018.09.005>
- Wessels, M. R. (2019). Capsular Polysaccharide of Group A *Streptococcus* [Article]. *Microbiology Spectrum*, 7(1), 12, Article Gpp3-0050-2018. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0050-2018>
- Wolfe, N. D., Dunavan, C. P., & Diamond, J. (2007). Origins of major human infectious diseases [Review]. *Nature*, 447(7142), 279-283. <https://doi.org/10.1038/nature05775>
- Woolhouse, M., & Gaunt, E. (2007). Ecological origins of novel human pathogens [Review]. *Critical Reviews in Microbiology*, 33(4), 231-242. <https://doi.org/10.1080/10408410701647560>
- Xu, S. Y., Liu, Y., Gao, J., Zhou, M., Yang, J. Y., He, F. M., . . . Han, B. (2021). Comparative Genomic Analysis of *Streptococcus dysgalactiae* subspecies *dysgalactiae* Isolated From Bovine Mastitis in China [Article]. *Frontiers in Microbiology*, 12, 14, Article 751863. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.751863>
- Yung, L., Rashid, M., & Brau, N. (2019). Group C *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* (SDSE) Endocarditis with Endogenous Endophthalmitis and Aortic Root Abscess [Article]. *Idcases*, 15, 3, Article UNSP e00513. <https://doi.org/10.1016/j.idcr.2019.e00513>
- Zapotoczna, M., McCarthy, H., Rudkin, J. K., O'Gara, J. P., & O'Neill, E. (2015). An Essential Role for Coagulase in *Staphylococcus aureus* Biofilm Development Reveals New Therapeutic Possibilities for Device-Related Infections [Article]. *Journal of Infectious Diseases*, 212(12), 1883-1893. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiv319>
- Zhang, H., Yang, F., Li, X. P., Luo, J. Y., Wang, L., Zhou, Y. L., . . . Li, H. S. (2020). Detection of antimicrobial resistance and virulence-related genes in *Streptococcus uberis* and *Streptococcus parauberis* isolated from clinical bovine mastitis cases in northwestern China [Article]. *Journal of Integrative Agriculture*, 19(11), 2784-2791. [https://doi.org/10.1016/s2095-3119\(20\)63185-9](https://doi.org/10.1016/s2095-3119(20)63185-9)
- Zhang, T. R., Niu, G. Y., Boonyayatra, S., & Pichpol, D. (2021). Antimicrobial Resistance Profiles and Genes in *Streptococcus uberis* Associated With Bovine Mastitis in Thailand [Article]. *Frontiers in Veterinary Science*, 8, 10, Article 705338. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.705338>
- Zhao, F., He, S., Tan, A. P., Guo, X. Z., Jiang, L., Cui, L. F., . . . Zhang, R. Q. (2020). Isolation, identification and character analysis of *Streptococcus dysgalactiae* from *Megalobrama terminalis* [Article]. *Journal of Fish Diseases*, 43(2), 239-252. <https://doi.org/10.1111/jfd.13119>
- Zhao, J. Z., Hayashi, T., Saarinen, S., Papageorgiou, A. C., Kato, H., Imanishi, K., . . . Miyoshi-Akiyama, T. (2007). Cloning, expression, and characterization of the superantigen streptococcal pyrogenic exotoxin G from *Streptococcus dysgalactiae* [Article]. *Infection and Immunity*, 75(4), 1721-1729. <https://doi.org/10.1128/iai.01183-06>

- Zhao, Y., Li, G., Yao, X. Y., Lu, S. G., Wang, J., Shen, X. D., & Li, M. (2019). The Impact of SsPI-1 Deletion on *Streptococcus suis* Virulence [Article]. *Pathogens*, 8(4), 9, Article 287. <https://doi.org/10.3390/pathogens8040287>
- Ziasistani, M., Shakibaie, M. R., & Kalantar-Neyestanaki, D. (2019). Genetic characterization of two vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates in Kerman, Iran [Article]. *Infection and Drug Resistance*, 12, 1869-1875. <https://doi.org/10.2147/idr.s205596>
- Zouharova, M., Nedbalcova, K., Slama, P., Bzdil, J., Masarikova, M., & Matiasovic, J. (2022). Occurrence of virulence-associated genes in *Streptococcus uberis* and *Streptococcus parauberis* isolated from bovine mastitis [Article]. *Veterinarni Medicina*, 67(3), 123-130. <https://doi.org/10.17221/95/2021-vetmed>
- Zuniga, E., Melville, P. A., Saidenberg, A. B. S., Laes, M. A., Gonsales, F. F., Salaberry, S. R. S., . . . Benites, N. R. (2015). Occurrence of genes coding for MSCRAMM and biofilm-associated protein Bap in *Staphylococcus* spp. isolated from bovine subclinical mastitis and relationship with somatic cell counts [Article]. *Microbial Pathogenesis*, 89, 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2015.08.014>

12. Spis tabel

Tabela 1. Startery użyte w procesie identyfikacji genetycznej.	45
Tabela 2. Startery zastosowane do wykrywania genów warunkujących kolonizację.	51
Tabela 3. Startery zastosowane do wykrywania genów kodujących czynniki inwazyjne.	52
Tabela 4. Startery zastosowane do wykrywania genów oporności.	53
Tabela 5. Startery kodujące geny metabolizmu podstawowego.....	55
Tabela 6. Startery zastosowane do wykrywania genów warunkujących kolonizację.	59
Tabela 7. Startery zastosowane do wykrywania genów odpowiedzialnych za produkcję biofilmu.....	60
Tabela 8. Startery zastosowane do wykrywania genów toksyn eksfoliatywnych i leukotoksyn.	60
Tabela 9. Startery zastosowane do wykrywania genów enterotoksyn.....	60
Tabela 10. Startery zastosowane do wykrywania genów oporności.	61
Tabela 11. Startery zastosowane do wykrywania genów metabolizmu podstawowego.	61
Tabela 12. Wyniki identyfikacji fenotypowej i genotypowej badanych szczepów izolowanych z zapalenia wymion krów.....	64
Tabela 13. Właściwości glikolityczne wybranych szczepów.	68
Tabela 14. Występowanie genów kodujących białka wiążące macierz zewnątrzkomórkową gospodarza.	70
Tabela 15. Cechy sprzyjające kolonizacji u szczepów produkujących biofilm.	73
Tabela 16. Stymulacja wzrostu szczepów SU i SDSD w obecności surowicy ludzkiej.	74
Tabela 17. Stymulacja wzrostu szczepów SDSE w obecności surowicy ludzkiej i bydlęcej.	74
Tabela 18. Względne poziomy ekspresji badanych genów dla wybranych szczepów paciorkowców.....	80
Tabela 19. Szczepy izolowane od zwierząt o cechach upodabniających je do szczepów izolowanych od ludzi.	82
Tabela 20. Szczepy izolowane od ludzi o zachowanych cechach szczepów gatunków izolowanych od zwierząt.....	82
Tabela 21. Obecność genów oporności występujących rzadziej w grupach szczepów izolowanych od zwierząt lub od ludzi.	87
Tabela 22. Typy sekwencyjne uzyskane w analizie MLST.	91
Tabela 23. Wrażliwość szczepów metycylinoopornych na wankomycynę i daptomycynę.	94
Tabela 24. Geny poszukiwane w ramach tej pracy obecne u innych gatunków paciorkowców.....	96

13. Spis rycin

Rycina 1. Markery wielkości DNA (od lewej DNA Marker 1, DNA Marker 2, DNA Marker 3).....	38
Rycina 2. Powiązania filogenetyczne pomiędzy badanymi szczepami SDS.....	65
Rycina 3. Materiał do badań zawierający paciorkowce <i>Streptococcus uberis</i>	66
Rycina 4. Rozdział produktów PCR w identyfikacji szczepów <i>S. gallolyticus</i>	67
Rycina 5. Cechy związane z niszczeniem tkanek i zaspokajaniem potrzeb pokarmowych odróżniające szczepy pochodzące od zwierząt od izolowanych od ludzi.	69
Rycina 6. Wyniki elektroforezy produktów PCR dla genu <i>isp1</i>	71
Rycina 7. Wyniki elektroforezy produktów PCR dla genu <i>sla</i>	72
Rycina 8. Wyniki elektroforezy produktów PCR dla genu <i>ska</i>	75
Rycina 9. Aktywność streptokinazy wobec plazminogenu ludzkiego i bydłęcego u wybranych szczepów.	76
Rycina 10. Poziomy ekspresji genów <i>scp</i> i <i>sicG</i> u wybranych szczepów.	77
Rycina 11. Wyniki elektroforezy produktów PCR dla genu <i>sdn</i>	78
Rycina 12. Występowanie genów streptolizyn wśród badanych szczepów.....	79
Rycina 13. Geny oporności klasy <i>erm</i> i <i>lnu</i> u szczepów z opornością typu MLS _B ...85	
Rycina 14. Odsetek szczepów o oporności na tetracyklinę, makrolidy, linkozamidy i streptograminę B wykazanej fenotypowo.....	86
Rycina 15. Geny oporności badanych szczepów.....	86
Rycina 16. Cechy różniące szczepy <i>S. pseudintermedius</i> izolowane od ludzi i zwierząt.	88
Rycina 17. Geny białek wiążących ECM u szczepów <i>S. pseudintermedius</i>	89
Rycina 18. Powiązania genetyczne pomiędzy uzyskanymi ST a występującymi na terenie Europy.	92
Rycina 19. Oporność na antybiotyki badanych szczepów <i>S. pseudintermedius</i>	94
Rycina 20. Aktywacja plazminogenu z udziałem i bez udziału streptokinazy.....	101

14. Aneks

Tabela A1A. Szczepy badane z gatunku *Streptococcus uberis* oraz *Streptococcus parauberis* pochodzące z infekcji u zwierząt – wyniki identyfikacji.

Lp.	Numer szczepu	Źródło szczepu	Pochodzenie	Identyfikacja fenotypowa	Identyfikacja genotypowa
1.	15	zapalenie wymion (mleko)	krowa	<i>S. uberis</i>	<i>S. uberis</i>
2.	33	zapalenie wymion (mleko)	krowa	<i>S. uberis</i>	<i>S. uberis</i>
3.	36	zapalenie wymion (mleko)	krowa	<i>S. uberis</i>	<i>S. uberis</i>
4.	39	zapalenie wymion (mleko)	krowa	<i>S. uberis</i>	<i>S. uberis</i>
5.	43	zapalenie wymion (mleko)	krowa	<i>S. uberis</i>	<i>S. uberis</i>
6.	70	zapalenie wymion (mleko)	krowa	<i>S. uberis</i>	<i>S. uberis</i>
7.	115	zapalenie wymion (mleko)	krowa	<i>S. uberis</i>	<i>S. uberis</i>
8.	120	zapalenie wymion (mleko)	krowa	<i>S. uberis</i>	<i>S. uberis</i>
9.	196	zapalenie wymion (mleko)	krowa	<i>S. uberis</i>	<i>S. uberis</i>
10.	233	zapalenie wymion (mleko)	krowa	<i>S. uberis</i>	<i>S. uberis</i>
11.	244	zapalenie wymion (mleko)	krowa	<i>S. uberis</i>	<i>S. uberis</i>
12.	249	zapalenie wymion (mleko)	krowa	<i>S. uberis</i>	<i>S. parauberis</i>
13.	261	zapalenie wymion (mleko)	krowa	<i>S. uberis</i>	<i>S. parauberis</i>
14.	272	zapalenie wymion (mleko)	krowa	<i>S. uberis</i>	<i>S. uberis</i>
15.	273	zapalenie wymion (mleko)	krowa	<i>S. uberis</i>	<i>S. uberis</i>
16.	279	zapalenie wymion (mleko)	krowa	<i>S. uberis</i>	<i>S. uberis</i>
17.	310	zapalenie wymion (mleko)	krowa	<i>S. uberis</i>	<i>S. uberis</i>
18.	340	zapalenie wymion (mleko)	krowa	<i>S. uberis</i>	<i>S. uberis</i>
19.	348	zapalenie wymion (mleko)	krowa	<i>S. uberis</i>	<i>S. uberis</i>
20.	351	zapalenie wymion (mleko)	krowa	<i>S. uberis</i>	<i>S. uberis</i>
21.	375	zapalenie wymion (mleko)	krowa	<i>S. agalactiae</i>	<i>S. uberis</i>
22.	389	zapalenie wymion (mleko)	krowa	<i>S. agalactiae</i>	<i>S. uberis</i>
23.	395	zapalenie wymion (mleko)	krowa	<i>S. uberis</i>	<i>S. uberis</i>
24.	401	zapalenie wymion (mleko)	krowa	<i>S. uberis</i>	<i>S. uberis</i>
25.	408	zapalenie wymion (mleko)	krowa	<i>S. porcinus</i>	<i>S. uberis</i>
26.	418	zapalenie wymion (mleko)	krowa	<i>S. uberis</i>	<i>S. uberis</i>
27.	584	zapalenie wymion (mleko)	krowa	<i>S. porcinus</i>	<i>S. uberis</i>

Tabela A1B. Szczepy badane z gatunku *Streptococcus dysgalactiae* pochodzące z infekcji u ludzi.

Lp.	Numer szczepu	Źródło szczepu	Pochodzenie	Identyfikacja MALDI-TOF MS	Identyfikacja genotypowa
1.	106	ropień	człowiek	<i>S. dysgalactiae</i>	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>
2.	159	gardło	człowiek	<i>S. dysgalactiae</i>	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>
3.	176	wymaz z wału paznokciowego	człowiek	<i>S. dysgalactiae</i>	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>
4.	202	ropień	człowiek	<i>S. dysgalactiae</i>	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>
5.	204	ucho	człowiek	<i>S. dysgalactiae</i>	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>
6.	213	pochwa	człowiek	<i>S. dysgalactiae</i>	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>
7.	252	ucho	człowiek	<i>S. dysgalactiae</i>	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>
8.	260	ucho	człowiek	<i>S. dysgalactiae</i>	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>
9.	279	pachwina	człowiek	<i>S. dysgalactiae</i>	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>
10.	282	rana	człowiek	<i>S. dysgalactiae</i>	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>
11.	296	rana	człowiek	<i>S. dysgalactiae</i>	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>
12.	301	owrzodzenie	człowiek	<i>S. dysgalactiae</i>	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>
13.	376	treść ropna	człowiek	<i>S. dysgalactiae</i>	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>
14.	387	wymaz z odleżyny	człowiek	<i>S. dysgalactiae</i>	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>
15.	430	gardło	człowiek	<i>S. dysgalactiae</i>	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>
16.	464	gardło	człowiek	<i>S. dysgalactiae</i>	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>
17.	468	nos	człowiek	<i>S. dysgalactiae</i>	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>
18.	469	rana	człowiek	<i>S. dysgalactiae</i>	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>
19.	475	pochwa	człowiek	<i>S. dysgalactiae</i>	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>
20.	515	rana	człowiek	<i>S. dysgalactiae</i>	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>
21.	540	rana	człowiek	<i>S. dysgalactiae</i>	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>
22.	543	rana	człowiek	<i>S. dysgalactiae</i>	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>
23.	588	rana	człowiek	<i>S. dysgalactiae</i>	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>
24.	598	gardło	człowiek	<i>S. dysgalactiae</i>	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>
25.	634	rana	człowiek	<i>S. dysgalactiae</i>	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>
26.	638	rana	człowiek	<i>S. dysgalactiae</i>	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>
27.	650	martwica stopy	człowiek	<i>S. dysgalactiae</i>	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>
28.	652	rana	człowiek	<i>S. dysgalactiae</i>	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>
29.	662	rana	człowiek	<i>S. dysgalactiae</i>	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>
30.	668	rana	człowiek	<i>S. dysgalactiae</i>	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>
31.	773	gardło	człowiek	<i>S. dysgalactiae</i>	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>
32.	2866	rana	człowiek	<i>S. dysgalactiae</i>	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>
33.	3674	pochwa	człowiek	<i>S. dysgalactiae</i>	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>
34.	5073	płyn z jamy otrzewnej	człowiek	<i>S. dysgalactiae</i>	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>
35.	8402	aspirat	człowiek	<i>S. dysgalactiae</i>	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>
36.	26529	owrzodzenie	człowiek	<i>S. dysgalactiae</i>	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>

Tabela A1C. Szczepy badane z gatunku *Streptococcus dysgalactiae* pochodzące z infekcji u zwierząt – wyniki identyfikacji.

Lp.	Numer szczepu	Źródło szczepu	Pochodzenie	Identyfikacja fenotypowa	Identyfikacja genotypowa
1.	350	zapalenie wymion (mleko)	krowa	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>dysgalactiae</i>	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>dysgalactiae</i>
2.	367	zapalenie wymion (mleko)	krowa	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>dysgalactiae</i>
3.	431	zapalenie wymion (mleko)	krowa	<i>S. uberis</i>	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>dysgalactiae</i>
4.	435	zapalenie wymion (mleko)	krowa	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>dysgalactiae</i>
5.	592	zapalenie wymion (mleko)	krowa	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>dysgalactiae</i>

Tabela A1D. Szczepy badane z gatunku *Streptococcus gallolyticus* pochodzące z infekcji u ludzi – wyniki identyfikacji.

Lp.	Numer szczepu	Źródło szczepu	Pochodzenie	Identyfikacja fenotypowa	Identyfikacja genotypowa
1.	1275	mocz	człowiek	<i>S. gallolyticus</i>	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i>
2.	1836	mocz	człowiek	<i>S. gallolyticus</i>	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i>
3.	2140	rana	człowiek	<i>S. gallolyticus</i>	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i>
4.	2185	mocz	człowiek	<i>S. gallolyticus</i>	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i>
5.	2200	kał	człowiek	<i>S. gallolyticus</i>	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i>
6.	2205	odbyt	człowiek	<i>S. gallolyticus</i>	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i>
7.	3851	odbyt	człowiek	<i>S. gallolyticus</i>	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i>
8.	4083	krw	człowiek	<i>S. gallolyticus</i>	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>
9.	5468	mocz	człowiek	<i>S. gallolyticus</i>	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i>
10.	5469	krw	człowiek	<i>S. gallolyticus</i>	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i>
11.	5523	rana	człowiek	<i>S. gallolyticus</i>	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i>

Tabela A2. Szczepy badane z rodzaju *Staphylococcus* pochodzące z infekcji u ludzi i zwierząt.

Lp.	Numer szczepu	Źródło szczepu	Pochodzenie	Identyfikacja MALDI-TOF MS	Identyfikacja genotypowa
1.	SPL 1	rana	człowiek	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i>
2.	SPL 2	rana	człowiek	<i>S. intermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i>
3.	SPL 3	rana	człowiek	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i>
4.	SPL 4	rana	człowiek	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i>
5.	SPL 5	jama brzuszna	człowiek	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i>
6.	SPL 6	ucho	człowiek	<i>S. intermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i>
7.	SPL 7	ucho	człowiek	<i>S. intermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i>
8.	SPZ 1	odleżyna	zwierzę	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i>
9.	SPZ 2	ucho	zwierzę	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i>
10.	SPZ 3	ucho	zwierzę	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i>
11.	SPZ 4	ucho	zwierzę	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i>
12.	SPZ 5	ucho	zwierzę	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i>
13.	SPZ 6	ucho	zwierzę	<i>S. intermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i>
14.	SPZ 7	rana	zwierzę	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i>

Tabela A3A1. Właściwości biochemiczne badanych szczepów *S. uberis*.

Lp.	Numer szczepu	Gatunek	Rodzaj hemolizy	Rozkład tłuszczów		Rozkład białek	
				Obecność lipazy	Obecność lecytynazy	Obecność kazeinazy	Obecność żelatynazy
1.	15	<i>S. uberis</i>	α	-	-	+	-
2.	33	<i>S. uberis</i>	α	-	-	+	-
3.	36	<i>S. uberis</i>	-	-	-	+	-
4.	39	<i>S. uberis</i>	-	-	-	+	+
5.	43	<i>S. uberis</i>	-	-	-	+	+
6.	70	<i>S. uberis</i>	-	-	-	+	-
7.	115	<i>S. uberis</i>	α	-	-	+	+
8.	120	<i>S. uberis</i>	α	-	-	+	-
9.	196	<i>S. uberis</i>	-	-	-	+	-
10.	233	<i>S. uberis</i>	α	-	-	+	-
11.	244	<i>S. uberis</i>	-	-	-	+	-
12.	249	<i>S. parauberis</i>	α	-	-	+	+
13.	261	<i>S. parauberis</i>	α	-	-	+	+
14.	272	<i>S. uberis</i>	α	-	-	+	-
15.	273	<i>S. uberis</i>	α	-	-	+	-
16.	279	<i>S. uberis</i>	-	-	-	+	-
17.	310	<i>S. uberis</i>	α	-	-	+	-
18.	340	<i>S. uberis</i>	α	-	-	+	-
19.	348	<i>S. uberis</i>	-	-	-	+	+
20.	351	<i>S. uberis</i>	-	-	-	+	+
21.	375	<i>S. uberis</i>	-	-	-	+	-
22.	389	<i>S. uberis</i>	-	-	-	+	-
23.	395	<i>S. uberis</i>	-	-	-	+	-
24.	401	<i>S. uberis</i>	-	-	-	+	-
25.	408	<i>S. uberis</i>	-	-	-	+	-
26.	418	<i>S. uberis</i>	-	-	-	+	+
27.	584	<i>S. uberis</i>	-	-	-	+	-

Tabela A3A2. Właściwości glikolityczne wybranych szczepów *S. uberis*.

Lp.	Numer szczepu	Gatunek	Rozkład cukrów			
			Laktoza	Fruktoza	Glukoza	Sorbitol
1.	15	<i>S. uberis</i>	+	+	+	+
2.	36	<i>S. uberis</i>	+	+	+	+
3.	39	<i>S. uberis</i>	+	+	+	+
4.	43	<i>S. uberis</i>	+	+	+	+
5.	196	<i>S. uberis</i>	+	+	+	+

Tabela A3B1. Właściwości biochemiczne badanych szczepów *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*.

Lp.	Numer szczepu	Gatunek	Rodzaj hemolizy	Rozkład tłuszczów		Rozkład białek	
				Obecność lipazy	Obecność lecytynazy	Obecność kazeinazy	Obecność żelatynazy
1.	106	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	β	-	-	-	+
2.	159	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	β	-	-	-	+
3.	176	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	β	-	-	-	-
4.	202	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	β	-	-	-	+
5.	204	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	β	-	-	-	+
6.	213	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	β	-	-	+	-
7.	252	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	β	-	-	+	+
8.	260	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	β	-	-	-	+
9.	279	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	β	-	-	-	+
10.	282	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	β	-	-	-	+
11.	296	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	β	-	-	-	-
12.	301	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	β	-	-	+	-
13.	376	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	β	-	-	-	+
14.	387	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	β	-	-	+	+
15.	430	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	β	-	-	+	+
16.	464	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	β	-	-	-	+
17.	468	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	β	-	-	-	+
18.	469	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	β	-	+	-	+
19.	475	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	β	-	-	+	+
20.	515	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	β	-	-	-	+
21.	540	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	β	-	-	-	-
22.	543	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	β	-	-	-	-
23.	588	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	β	-	-	-	-
24.	598	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	β	-	-	-	+
25.	634	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	β	-	-	+	-
26.	638	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	β	-	+	-	+

27.	650	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	β	-	-	-	+
28.	652	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	β	-	-	+	+
29.	662	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	β	-	-	-	+
30.	668	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	β	-	-	-	+
31.	773	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	β	-	+	-	-
32.	2866	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	β	-	+	-	-
33.	3674	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	β	-	+	-	-
34.	5073	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	β	-	+	+	-
35.	8402	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	β	-	+	-	-
36.	26529	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	β	-	+	+	-

Tabela A3B2. Właściwości glikolityczne wybranych szczepów *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis*.

Lp.	Numer szczepu	Gatunek	Rozkład cukrów			
			Laktoza	Fruktoza	Glukoza	Sorbitol
1.	159	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	-	-	+	-
2.	176	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	-	-	+	-
3.	202	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	-	+	+	-
4.	252	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	+	+	+	-
5.	387	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	-	+	+	-
6.	540	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	-	-	+	-
7.	634	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	+	+	+	-
8.	3674	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	+	+	+	-
9.	26529	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	+	-	+	-

Tabela A3C1. Właściwości biochemiczne badanych szczepów *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae*.

Lp.	Numer szczepu	Gatunek	Rodzaj hemolizy	Rozkład tłuszczów		Rozkład białek	
				Obecność lipazy	Obecność lecytynazy	Obecność kazeinazy	Obecność żelatynazy
1.	350	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>dysgalactiae</i>	α	-	-	+	+
2.	367	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>dysgalactiae</i>	α	-	-	+	+
3.	431	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>dysgalactiae</i>	α	-	-	+	-
4.	435	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>dysgalactiae</i>	α	-	-	+	-
5.	592	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>dysgalactiae</i>	α	-	-	+	-

Tabela A3C2. Właściwości glikolityczne wybranych szczepów *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae*.

Lp.	Numer szczepu	Gatunek	Rozkład cukrów			
			Laktoza	Fruktoza	Glukoza	Sorbitol
1.	350	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>dysgalactiae</i>	+	+	-	-
2.	367	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>dysgalactiae</i>	+	+	+	+
3.	431	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>dysgalactiae</i>	+	+	+	-

Tabela A3D1. Właściwości biochemiczne badanych szczepów *S. gallolyticus*.

Lp.	Numer szczepu	Gatunek	Rodzaj hemolizy	Rozkład tłuszczów		Rozkład białek	
				Obecność lipazy	Obecność lecytynazy	Obecność kazeinazy	Obecność żelatynazy
1.	1275	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i>	-	-	-	+	-
2.	1836	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i>	-	-	-	+	-
3.	2140	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i>	-	-	-	+	-
4.	2185	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i>	-	-	-	-	-
5.	2200	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i>	-	-	-	+	-
6.	2205	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i>	-	-	-	+	-
7.	3851	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i>	-	-	-	-	-
8.	4083	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	-	-	-	+	-
9.	5468	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i>	-	-	-	+	-
10.	5469	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i>	-	-	-	+	-
11.	5523	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i>	-	-	-	+	-

Tabela A3D2. Właściwości glikolityczne wybranych szczepów *S. gallolyticus*.

Lp.	Numer szczepu	Gatunek	Rozkład cukrów			
			Laktoza	Fruktoza	Glukoza	Sorbitol
1.	1275	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i>	+	+	+	-
2.	3851	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i>	+	+	+	-
3.	5468	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i>	+	+	+	-

Tabela A4A. Obecność genów kodujących czynniki warunkujące kolonizację u badanych szczepów *S. uberis* oraz *S. parauberis*.

Lp.	Numer szczepu	Gatunek	Geny kodujące czynniki kolonizacji									
			<i>cbp</i>	<i>fbp</i>	<i>gapC</i>	<i>hylB</i>	<i>lmb</i>	<i>prtF1</i>	<i>prtF2</i>	<i>sla</i>	<i>mtuA</i>	<i>sua</i>
1.	15	<i>S. uberis</i>	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-
2.	33	<i>S. uberis</i>	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+
3.	36	<i>S. uberis</i>	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-
4.	39	<i>S. uberis</i>	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+
5.	43	<i>S. uberis</i>	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+
6.	70	<i>S. uberis</i>	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+
7.	115	<i>S. uberis</i>	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-
8.	120	<i>S. uberis</i>	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+
9.	196	<i>S. uberis</i>	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+
10.	233	<i>S. uberis</i>	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+
11.	244	<i>S. uberis</i>	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+
12.	249	<i>S. parauberis</i>	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+
13.	261	<i>S. parauberis</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-
14.	272	<i>S. uberis</i>	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+
15.	273	<i>S. uberis</i>	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+
16.	279	<i>S. uberis</i>	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+
17.	310	<i>S. uberis</i>	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+
18.	340	<i>S. uberis</i>	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+
19.	348	<i>S. uberis</i>	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-
20.	351	<i>S. uberis</i>	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+
21.	375	<i>S. uberis</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+
22.	389	<i>S. uberis</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+
23.	395	<i>S. uberis</i>	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+
24.	401	<i>S. uberis</i>	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+
25.	408	<i>S. uberis</i>	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+
26.	418	<i>S. uberis</i>	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+
27.	584	<i>S. uberis</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+

Tabela A4B. Obecność genów kodujących czynniki warunkujące kolonizację u badanych szczepów *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis*.

Lp.	Numer szczepu	Gatunek	Geny kodujące czynniki kolonizacji							
			<i>cbp</i>	<i>fbp</i>	<i>gapC</i>	<i>hylB</i>	<i>lmb</i>	<i>prtF1</i>	<i>prtF2</i>	<i>sla</i>
1.	106	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	-	-	+	+	+	+	-	-
2.	159	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	-	-	+	+	+	+	-	-
3.	176	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	-	-	+	+	+	-	-	-
4.	202	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	-	-	+	+	+	+	-	-
5.	204	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	-	-	+	-	-	-	-	-
6.	213	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	-	-	+	+	+	+	-	-
7.	252	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	-	-	+	+	+	+	-	-
8.	260	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	-	-	+	-	-	-	-	-
9.	279	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	-	-	+	+	+	-	-	-
10.	282	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	-	-	+	+	+	-	-	-
11.	296	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	-	-	+	+	+	-	-	-
12.	301	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	-	-	+	+	+	+	-	-
13.	376	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	-	-	+	+	+	+	-	-
14.	387	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	+	-	+	+	+	+	-	-
15.	430	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	-	-	+	+	+	-	-	-
16.	464	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	-	-	+	+	+	+	-	-
17.	468	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	-	-	+	+	+	-	-	-
18.	469	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	-	-	+	+	+	+	-	-
19.	475	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	-	-	+	+	+	-	-	-
20.	515	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	-	-	+	+	+	+	-	-
21.	540	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	-	-	+	+	+	+	-	-
22.	543	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	-	-	+	+	+	-	-	-
23.	588	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	-	-	+	+	+	+	-	-
24.	598	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	-	+	+	+	+	+	-	-
25.	634	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	-	-	+	+	+	+	-	-
26.	638	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	-	-	+	+	+	+	-	-
27.	650	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	-	-	+	+	+	+	-	-
28.	652	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	-	-	+	+	+	-	-	-
29.	662	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	-	-	+	+	+	-	-	-
30.	668	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	-	-	+	+	+	-	-	-
31.	773	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	-	-	+	+	+	+	-	-
32.	2866	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	-	-	+	-	+	-	-	-
33.	3674	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	-	-	+	+	+	-	-	-
34.	5073	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	-	+	+	-	+	-	-	-
35.	8402	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	-	+	+	+	+	-	-	-
36.	26529	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	-	+	+	+	+	-	-	-

A4C. Obecność genów kodujących czynniki warunkujące kolonizację u badanych szczepów *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae*.

Lp.	Numer szczepu	Gatunek	Geny kodujące czynniki kolonizacji							
			<i>cbp</i>	<i>fbp</i>	<i>gapC</i>	<i>hylB</i>	<i>lmb</i>	<i>prtF1</i>	<i>prtF2</i>	<i>sla</i>
1.	350	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>dysgalactiae</i>	-	-	+	-	+	+	-	-
2.	367	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>dysgalactiae</i>	-	+	+	-	+	-	-	-
3.	431	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>dysgalactiae</i>	-	-	+	-	+	+	-	-
4.	435	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>dysgalactiae</i>	-	-	+	-	+	-	-	-
5.	592	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>dysgalactiae</i>	-	-	+	-	+	-	-	-

A4D. Obecność genów czynniki warunkujące kolonizację u badanych szczepów *S. gallolyticus*.

Lp.	Numer szczepu	Gatunek	Geny kodujące czynniki kolonizacji							
			<i>cbp</i>	<i>fbp</i>	<i>gapC</i>	<i>hylB</i>	<i>lmb</i>	<i>prtF1</i>	<i>prtF2</i>	<i>sla</i>
1.	1275	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
2.	1836	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
3.	2140	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
4.	2185	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
5.	2200	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
6.	2205	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
7.	3851	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i>	-	-	-	-	+	-	-	-
8.	4083	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	-	-	+	-	-	-	-	-
9.	5468	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i>	-	-	-	-	+	-	-	-
10.	5469	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
11.	5523	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i>	-	-	+	-	-	-	-	-

A5A. Zdolność do tworzenia biofilmu przez badane szczepy *S. uberis* i *S. parauberis*.

Lp.	Numer szczepu	Gatunek	Średnia wartość absorbancji	Zdolność do wytwarzania biofilmu
1.	15	<i>S. uberis</i>	0,020	-
2.	33	<i>S. uberis</i>	0,032	-
3.	36	<i>S. uberis</i>	0,034	-
4.	39	<i>S. uberis</i>	0,021	-
5.	43	<i>S. uberis</i>	0,000	-
6.	70	<i>S. uberis</i>	0,029	-
7.	115	<i>S. uberis</i>	0,123	słaba
8.	120	<i>S. uberis</i>	0,050	-
9.	196	<i>S. uberis</i>	0,108	słaba
10.	233	<i>S. uberis</i>	0,131	słaba
11.	244	<i>S. uberis</i>	0,067	-
12.	249	<i>S. parauberis</i>	0,060	-
13.	261	<i>S. parauberis</i>	0,061	-
14.	272	<i>S. uberis</i>	0,033	-
15.	273	<i>S. uberis</i>	0,032	-
16.	279	<i>S. uberis</i>	0,027	-
17.	310	<i>S. uberis</i>	0,134	słaba
18.	340	<i>S. uberis</i>	0,135	słaba
19.	348	<i>S. uberis</i>	0,055	-
20.	351	<i>S. uberis</i>	0,157	słaba
21.	375	<i>S. uberis</i>	0,060	-
22.	389	<i>S. uberis</i>	0,051	-
23.	395	<i>S. uberis</i>	0,062	-
24.	401	<i>S. uberis</i>	0,020	-
25.	408	<i>S. uberis</i>	0,046	-
26.	418	<i>S. uberis</i>	0,129	słaba
27.	584	<i>S. uberis</i>	0,036	-

A5B. Zdolność do tworzenia biofilmu przez badane szczepy *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis*.

Lp.	Numer szczepu	Gatunek	Średnia wartość absorbancji	Zdolność do wytwarzania biofilmu
1.	106	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	0,018	-
2.	159	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	0,014	-
3.	176	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	0,017	-
4.	202	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	0,007	-
5.	204	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	0,016	-
6.	213	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	0,026	-
7.	252	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	0,006	-
8.	260	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	0,020	-
9.	279	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	0,057	-
10.	282	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	0,003	-
11.	296	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	0,062	-
12.	301	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	0,000	-
13.	376	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	0,036	-
14.	387	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	0,008	-
15.	430	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	0,046	-
16.	464	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	0,044	-
17.	468	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	0,011	-
18.	469	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	0,086	-
19.	475	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	0,046	-
20.	515	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	0,049	-
21.	540	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	0,000	-
22.	543	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	0,030	-
23.	588	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	0,049	-
24.	598	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	0,020	-
25.	634	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	0,016	-
26.	638	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	0,028	-
27.	650	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	0,083	-
28.	652	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	0,080	-
29.	662	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	0,000	-
30.	668	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	0,000	-
31.	773	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	0,015	-
32.	2866	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	0,000	-
33.	3674	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	0,006	-
34.	5073	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	0,000	-
35.	8402	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	0,000	-
36.	26529	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	0,042	-

A5C. Zdolność do tworzenia biofilmu przez badane szczepy *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae*.

Lp.	Numer szczepu	Gatunek	Średnia wartość absorbancji	Zdolność do wytwarzania biofilmu
1.	350	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>dysgalactiae</i>	0,038	-
2.	367	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>dysgalactiae</i>	0,057	-
3.	431	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>dysgalactiae</i>	0,037	-
4.	435	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>dysgalactiae</i>	0,016	-
5.	592	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>dysgalactiae</i>	0,000	-

A5D. Zdolność do tworzenia biofilmu przez badane szczepy *S. gallolyticus*.

Lp.	Numer szczepu	Gatunek	Średnia wartość absorbancji	Zdolność do wytwarzania biofilmu
1.	1275	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i>	0,179	słaba
2.	1836	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i>	0,116	słaba
3.	2140	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i>	0,110	słaba
4.	2185	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i>	0,000	-
5.	2200	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i>	0,028	-
6.	2205	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i>	0,045	-
7.	3851	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i>	0,117	słaba
8.	4083	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	0,020	-
9.	5468	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i>	0,010	-
10.	5469	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i>	0,027	-
11.	5523	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i>	0,000	-

A6A. Wyrastanie w surowicy ludzkiej i bydlęcej badanych szczepów *S. uberis* i *S. parauberis*.

Lp.	Numer szczepu	Gatunek	Wzrost w obecności surowicy ludzkiej	Wzrost w obecności surowicy bydlęcej
1.	15	<i>S. uberis</i>	-	-
2.	33	<i>S. uberis</i>	I	S
3.	36	<i>S. uberis</i>	I	-
4.	39	<i>S. uberis</i>	I	I
5.	43	<i>S. uberis</i>	I	-
6.	70	<i>S. uberis</i>	I	-
7.	115	<i>S. uberis</i>	S	-
8.	120	<i>S. uberis</i>	S	-
9.	196	<i>S. uberis</i>	I	-
10.	233	<i>S. uberis</i>	S	-
11.	244	<i>S. uberis</i>	S	S
12.	249	<i>S. parauberis</i>	S	-
13.	261	<i>S. parauberis</i>	S	S
14.	272	<i>S. uberis</i>	-	-
15.	273	<i>S. uberis</i>	S	S
16.	279	<i>S. uberis</i>	S	S
17.	310	<i>S. uberis</i>	S	-
18.	340	<i>S. uberis</i>	S	S
19.	348	<i>S. uberis</i>	S	-
20.	351	<i>S. uberis</i>	S	-
21.	375	<i>S. uberis</i>	S	S
22.	389	<i>S. uberis</i>	-	-
23.	395	<i>S. uberis</i>	-	S
24.	401	<i>S. uberis</i>	I	I
25.	408	<i>S. uberis</i>	-	-
26.	418	<i>S. uberis</i>	-	-
27.	584	<i>S. uberis</i>	I	I

„I” – zahamowanie wzrostu, „S” – stymulacja wzrostu, „-” – brak wpływu surowicy na wzrost

A6B. Wyrastanie w surowicy ludzkiej i bydlęcej badanych szczepów *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis*.

Lp.	Numer szczepu	Gatunek	Wzrost w obecności surowicy ludzkiej	Wzrost w obecności surowicy bydlęcej
1.	106	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	-	-
2.	159	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	S	-
3.	176	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	S	-
4.	202	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	S	-
5.	204	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	S	S
6.	213	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	-	-
7.	252	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	S	-
8.	260	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	S	S
9.	279	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	S	S
10.	282	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	S	-
11.	296	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	-	-
12.	301	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	-	S
13.	376	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	S	S
14.	387	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	S	S
15.	430	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	S	-
16.	464	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	S	S
17.	468	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	S	-
18.	469	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	S	S
19.	475	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	S	S
20.	515	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	-	S
21.	540	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	-	-
22.	543	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	-	-
23.	588	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	S	S
24.	598	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	-	-
25.	634	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	S	-
26.	638	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	-	-
27.	650	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	-	-
28.	652	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	S	-
29.	662	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	I	I
30.	668	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	-	-
31.	773	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	-	-
32.	2866	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	S	S
33.	3674	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	S	I
34.	5073	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	S	S
35.	8402	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	S	S
36.	26529	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	-	-

„I” – zahamowanie wzrostu, „S” – stymulacja wzrostu, „-” – brak wpływu surowicy na wzrost

A6C. Wyrastanie w surowicy ludzkiej i bydlęcej badanych szczepów *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae*.

Lp.	Numer szczepu	Gatunek	Wzrost w obecności surowicy ludzkiej	Wzrost w obecności surowicy bydlęcej
1.	350	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>dysgalactiae</i>	S	S
2.	367	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>dysgalactiae</i>	S	S
3.	431	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>dysgalactiae</i>	S	S
4.	435	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>dysgalactiae</i>	I	I
5.	592	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>dysgalactiae</i>	S	S

„I” – zahamowanie wzrostu, „S” – stymulacja wzrostu, „-” – brak wpływu surowicy na wzrost

A6D. Wyrastanie w surowicy ludzkiej i bydlęcej badanych szczepów *S. gallolyticus*.

Lp.	Numer szczepu	Gatunek	Wzrost w obecności surowicy ludzkiej	Wzrost w obecności surowicy bydlęcej
1.	1275	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i>	I	I
2.	1836	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i>	I	I
3.	2140	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i>	-	-
4.	2185	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i>	-	S
5.	2200	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i>	I	I
6.	2205	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i>	-	I
7.	3851	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i>	-	I
8.	4083	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	-	-
9.	5468	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i>	-	-
10.	5469	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i>	-	-
11.	5523	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i>	-	I

„I” – zahamowanie wzrostu, „S” – stymulacja wzrostu, „-” – brak wpływu surowicy na wzrost

Tabela A7A. Aktywność streptokinazy wobec plazminogenu ludzkiego i bydlęcego u szczepów *S. uberis*.

Lp.	Numer szczepu	Gatunek	Aktywność streptokinazy [U/ml]			
			Plazminogen ludzki		Plazminogen bydlęcy	
			Metoda jakościowa	Metoda ilościowa	Metoda jakościowa	Metoda ilościowa
1.	36	<i>S. uberis</i>	-	9,62 x10 ⁻⁴	+	3496,02 x10 ⁻⁴
2.	395	<i>S. uberis</i>	-	8,80 x10 ⁻⁴	+	2853,66 x10 ⁻⁴

Tabela A7B. Aktywność streptokinazy wobec plazminogenu ludzkiego i bydlęcego u szczepów *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis*.

Lp.	Numer szczepu	Gatunek	Aktywność streptokinazy [U/ml]			
			Plazminogen ludzki		Plazminogen bydlęcy	
			Metoda jakościowa	Metoda ilościowa	Metoda jakościowa	Metoda ilościowa
1.	159	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	+	434,96 x10 ⁻⁴	+	630,90 x10 ⁻⁴
2.	176	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	+	396,22 x10 ⁻⁴	+	572,32 x10 ⁻⁴
3.	202	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	+	1246,83 x10 ⁻⁴	+	837,75 x10 ⁻⁴
4.	252	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	+	1103,62 x10 ⁻⁴	+	641,89 x10 ⁻⁴
5.	387	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	+	52,12 x10 ⁻⁴	+	685,20 x10 ⁻⁴
6.	540	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	+	1096,16 x10 ⁻⁴	+	585,81 x10 ⁻⁴
7.	634	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	+	54,06 x10 ⁻⁴	+	628,72 x10 ⁻⁴
8.	3674	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	+	17,70 x10 ⁻⁴	+	964,77 x10 ⁻⁴
9.	26529	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	+	1180,40 x10 ⁻⁴	+	668,39 x10 ⁻⁴

Tabela A7C. Aktywność streptokinazy wobec plazminogenu ludzkiego i bydlęcego u szczepów *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae*.

Lp.	Numer szczepu	Gatunek	Aktywność streptokinazy [U/ml]			
			Plazminogen ludzki		Plazminogen bydlęcy	
			Metoda jakościowa	Metoda ilościowa	Metoda jakościowa	Metoda ilościowa
1.	350	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>dysgalactiae</i>	-	47,68 x10 ⁻⁴	+	3479,59 x10 ⁻⁴
2.	367	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>dysgalactiae</i>	-	13,20 x10 ⁻⁴	+	2947,81 x10 ⁻⁴
3.	431	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>dysgalactiae</i>	-	6,38 x10 ⁻⁴	+	891,24 x10 ⁻⁴

Tabela A7D. Aktywność streptokinazy wobec plazminogenu ludzkiego i bydlęcego u szczepów *S. gallolyticus*.

Lp.	Numer szczepu	Gatunek	Aktywność streptokinazy [U/ml]			
			Plazminogen ludzki		Plazminogen bydlęcy	
			Metoda jakościowa	Metoda ilościowa	Metoda jakościowa	Metoda ilościowa
1.	1275	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i>	-	9,05 x10 ⁻⁴	+	618,37 x10 ⁻⁴
2.	3851	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i>	-	13,25 x10 ⁻⁴	+	605,61 x10 ⁻⁴
3.	5468	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i>	-	11,96 x10 ⁻⁴	+	624,43 x10 ⁻⁴

Tabela A8A1. Obecność genów kodujących czynniki warunkujące inwazyjność u badanych szczepów *S. uberis* i *S. parauberis*.

Lp.	Numer szczepu	Gatunek	Geny kodujące inwazyjność						
			<i>ska</i>	<i>sagA</i>	<i>slo</i>	<i>scp</i>	<i>sicG</i>	<i>dpp</i>	<i>isp1</i>
1.	15	<i>S. uberis</i>	-	+	+	-	-	-	-
2.	33	<i>S. uberis</i>	-	+	+	-	-	-	+
3.	36	<i>S. uberis</i>	+	+	+	-	-	-	-
4.	39	<i>S. uberis</i>	-	+	+	-	-	-	+
5.	43	<i>S. uberis</i>	-	+	+	-	-	-	+
6.	70	<i>S. uberis</i>	-	-	+	-	-	-	-
7.	115	<i>S. uberis</i>	-	+	+	-	-	-	-
8.	120	<i>S. uberis</i>	-	+	+	-	-	-	-
9.	196	<i>S. uberis</i>	+	+	+	-	-	-	-
10.	233	<i>S. uberis</i>	-	+	+	-	-	-	+
11.	244	<i>S. uberis</i>	-	+	+	-	-	-	-
12.	249	<i>S. parauberis</i>	-	+	-	-	-	-	-
13.	261	<i>S. parauberis</i>	-	+	-	-	-	-	+
14.	272	<i>S. uberis</i>	-	+	+	-	-	-	+
15.	273	<i>S. uberis</i>	-	+	+	-	-	-	-
16.	279	<i>S. uberis</i>	+	+	+	-	-	-	+
17.	310	<i>S. uberis</i>	-	+	+	-	-	-	-
18.	340	<i>S. uberis</i>	+	+	+	-	-	-	-
19.	348	<i>S. uberis</i>	-	+	-	-	-	-	-
20.	351	<i>S. uberis</i>	+	+	+	-	-	+	+
21.	375	<i>S. uberis</i>	+	+	+	-	-	-	-
22.	389	<i>S. uberis</i>	+	+	+	-	-	-	+
23.	395	<i>S. uberis</i>	+	+	+	+	-	+	+
24.	401	<i>S. uberis</i>	+	+	+	-	-	-	+
25.	408	<i>S. uberis</i>	-	+	-	-	-	-	-
26.	418	<i>S. uberis</i>	-	+	-	-	-	-	-
27.	584	<i>S. uberis</i>	+	+	+	-	-	-	-

Tabela A8A2. Obecność genów kodujących DNazy paciorkowcowe u wybranych szczepów *S. uberis*.

Lp.	Numer szczepu	Gatunek	Geny kodujące DNazy	
			<i>sdn</i>	<i>spd1</i>
1.	15	<i>S. uberis</i>	-	-
2.	36	<i>S. uberis</i>	+	-
3.	39	<i>S. uberis</i>	-	-
4.	43	<i>S. uberis</i>	-	-
5.	196	<i>S. uberis</i>	+	-
6.	233	<i>S. uberis</i>	-	-
7.	244	<i>S. uberis</i>	+	-
8.	272	<i>S. uberis</i>	-	-
9.	273	<i>S. uberis</i>	-	-
10.	310	<i>S. uberis</i>	-	-
11.	348	<i>S. uberis</i>	-	-
12.	395	<i>S. uberis</i>	-	-
13.	418	<i>S. uberis</i>	-	-

Tabela A8B1. Obecność genów kodujących czynniki warunkujące inwazyjność u badanych szczepów *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis*.

Lp.	Numer szczepu	Gatunek	Geny kodujące inwazyjność						
			<i>ska</i>	<i>sagA</i>	<i>slo</i>	<i>scp</i>	<i>sicG</i>	<i>dpp</i>	<i>isp1</i>
1.	106	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	+	-	+	+	-	+	+
2.	159	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	+	+	+	+	-	+	+
3.	176	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	+	+	+	+	-	+	+
4.	202	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	+	-	+	+	-	+	-
5.	204	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	+	-	-	-	-	-	-
6.	213	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	+	-	+	+	-	+	+
7.	252	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	+	+	+	+	-	+	-
8.	260	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	+	-	-	-	-	-	-
9.	279	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	+	-	+	+	-	+	-
10.	282	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	+	-	+	+	-	+	+
11.	296	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	+	-	+	+	-	+	+
12.	301	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	+	-	+	+	-	+	+
13.	376	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	+	+	+	+	-	+	+
14.	387	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	+	+	+	+	+	+	+
15.	430	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	+	-	+	+	-	+	+
16.	464	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	+	+	+	+	-	+	+
17.	468	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	+	-	-	+	-	+	+
18.	469	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	+	+	+	+	-	+	+
19.	475	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	+	+	+	+	-	+	+
20.	515	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	+	+	+	+	-	+	+
21.	540	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	+	+	+	+	-	+	+
22.	543	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	+	-	+	+	-	+	+
23.	588	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	+	+	+	+	-	+	+
24.	598	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	+	+	-	+	-	+	+
25.	634	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	+	+	+	+	-	+	+
26.	638	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	+	-	+	+	-	+	+
27.	650	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	+	+	+	+	-	+	+
28.	652	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	+	-	+	+	-	+	+
29.	662	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	+	-	+	+	-	+	+
30.	668	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	+	-	+	+	-	+	+
31.	773	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	+	+	+	+	-	+	+
32.	2866	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	+	+	+	+	-	+	+
33.	3674	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	+	+	+	+	+	-	+
34.	5073	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	+	+	+	+	-	+	+
35.	8402	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	+	+	+	+	-	+	+
36.	26529	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	+	+	+	+	+	+	+

Tabela A8B2. Obecność genów kodujących DNazy paciorkowcowe u wybranych szczepów *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis*.

Lp.	Numer szczepu	Gatunek	Geny kodujące DNazy	
			<i>sdn</i>	<i>spd1</i>
1.	159	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	-	-
2.	176	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	-	-
3.	202	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	-	-
4.	252	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	-	-
5.	387	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	-	-
6.	540	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	-	-
7.	634	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	-	-
8.	3674	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	-	-
9.	26529	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	-	-

Tabela A8C. Obecność genów kodujących czynniki warunkujące inwazyjność u badanych szczepów *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae*.

Lp.	Numer szczepu	Gatunek	Geny kodujące inwazyjność						
			<i>ska</i>	<i>sagA</i>	<i>slo</i>	<i>scp</i>	<i>sicG</i>	<i>dpp</i>	<i>isp1</i>
1.	350	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>dysgalactiae</i>	+	-	-	+	-	-	-
2.	367	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>dysgalactiae</i>	+	+	-	+	-	+	+
3.	431	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>dysgalactiae</i>	+	-	+	-	-	-	-
4.	435	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>dysgalactiae</i>	+	-	-	+	-	-	-
5.	592	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>dysgalactiae</i>	+	-	-	-	-	-	-

Tabela A8Cc. Obecność genów kodujących DNazy paciorkowcowe u wybranych szczepów *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae*.

Lp.	Numer szczepu	Gatunek	Geny kodujące DNazy	
			<i>sdn</i>	<i>spd1</i>
1.	350	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>dysgalactiae</i>	-	-
2.	367	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>dysgalactiae</i>	+	-
3.	431	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>dysgalactiae</i>	+	-
4.	435	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>dysgalactiae</i>	-	-
5.	592	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>dysgalactiae</i>	-	-

Tabela A8D. Obecność genów kodujących czynniki warunkujące inwazyjność u badanych szczepów *S. gallolyticus*.

Lp.	Numer szczepu	Gatunek	Geny kodujące inwazyjność						
			<i>ska</i>	<i>sagA</i>	<i>slo</i>	<i>scp</i>	<i>sicG</i>	<i>dpp</i>	<i>isp1</i>
1.	1275	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i>	+	-	+	+	-	-	+
2.	1836	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i>	+	-	-	+	-	-	+
3.	2140	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i>	-	+	+	+	-	-	+
4.	2185	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i>	+	-	-	+	-	-	+
5.	2200	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i>	+	-	-	+	-	-	+
6.	2205	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i>	-	-	-	-	-	-	-
7.	3851	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i>	+	+	+	+	-	-	+
8.	4083	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	-	-	-	-	-	+	-
9.	5468	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i>	+	+	-	+	-	-	+
10.	5469	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i>	-	-	+	+	-	-	+
11.	5523	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i>	-	-	+	+	-	+	+

Tabela A9A. Ekspresja wybranych genów wirulencji u szczepów *S. uberis*.

Lp.	Numer szczepu	Gatunek	Nazwa genu		
			<i>ska</i>	<i>scp</i>	<i>sla</i>
1.	36	<i>S. uberis</i>	+	nb	+
2.	395	<i>S. uberis</i>	+	+	nb

nb – nie badano, “+” – ekspresja genu, „-”, – brak ekspresji genu

Tabela A9B. Ekspresja wybranych genów wirulencji u szczepów *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis*.

Lp.	Numer szczepu	Gatunek	Nazwa genu		
			<i>ska</i>	<i>scp</i>	<i>sicG</i>
1.	159	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	-	+	nb
2.	176	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	+	+	nb
3.	202	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	+	+	nb
4.	252	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	+	+	nb
5.	387	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	+	+	+
6.	540	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	+	+	nb
7.	634	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	+	+	nb
8.	3674	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	+	+	+
9.	26529	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	+	+	+

nb – nie badano, “+” – ekspresja genu, „-”, – brak ekspresji genu

Tabela A9C. Ekspresja wybranych genów wirulencji u szczepów *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae*.

Lp.	Numer szczepu	Gatunek	Nazwa genu	
			<i>ska</i>	<i>scp</i>
1.	350	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>dysgalactiae</i>	-	+
2.	367	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>dysgalactiae</i>	+	+
3.	431	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>dysgalactiae</i>	-	nb

nb – nie badano, “+” – ekspresja genu, „-”, – brak ekspresji genu

Tabela A9D. Ekspresja wybranych genów wirulencji u szczepów *S. gallolyticus*.

Lp.	Numer szczepu	Gatunek	Nazwa genu	
			<i>ska</i>	<i>scp</i>
1.	1275	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i>	+	+
2.	3851	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i>	+	+
3.	5468	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i>	+	+

nb – nie badano, “+” – ekspresja genu, „-”, – brak ekspresji genu

Tabela A10A. Profil lekowrażliwości badanych szczepów *S. uberis* i *S. parauberis*.

Lp.	Numer szczepu	Gatunek	Nazwa antybiotyku i stężenie										
			PEN 1 µg	NOR 10 µg	ERY 15 µg	CLI 2 µg	TET 30 µg	VAN 5 µg	TGC 15 µg	LZD 10 µg	CHL 30 µg	RIF 5 µg	SXT 25 µg
1.	15	<i>S. uberis</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
2.	33	<i>S. uberis</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
3.	36	<i>S. uberis</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
4.	39	<i>S. uberis</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
5.	43	<i>S. uberis</i>	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S
6.	70	<i>S. uberis</i>	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S
7.	115	<i>S. uberis</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
8.	120	<i>S. uberis</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
9.	196	<i>S. uberis</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
10.	233	<i>S. uberis</i>	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S
11.	244	<i>S. uberis</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
12.	249	<i>S. parauberis</i>	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S
13.	261	<i>S. parauberis</i>	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S
14.	272	<i>S. uberis</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
15.	273	<i>S. uberis</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
16.	279	<i>S. uberis</i>	S	S	R**	R	S	S	S	S	S	S	S
17.	310	<i>S. uberis</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
18.	340	<i>S. uberis</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
19.	348	<i>S. uberis</i>	S	S	R***	S	S	S	S	S	S	R	S
20.	351	<i>S. uberis</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
21.	375	<i>S. uberis</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
22.	389	<i>S. uberis</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
23.	395	<i>S. uberis</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
24.	401	<i>S. uberis</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
25.	408	<i>S. uberis</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
26.	418	<i>S. uberis</i>	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S
27.	584	<i>S. uberis</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

PEN – penicylina, NOR – norfloksacyna, ERY – erytromycyna, CLI – klindamycyna, TET – tetracyklina, VAN – wankomycyna, TGC – tigecyklina, LZD – linezolid, CHL – chloramfenikol, RIF – rifampicyna, SXT – trimethoprim/sulfametoksazol, „R” – oporny, „S” – wrażliwy, „R*” – iMLS_B, „R**” – cMLS_B, „R***” – M-fenotyp MLS_B

A10B. Profil lekowrażliwości badanych szczepów *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis*.

Lp.	Numer szczepu	Gatunek	Nazwa antybiotyku i stężenie										
			PEN 1 µg	NOR 10 µg	ERY 15 µg	CLI 2 µg	TET 30 µg	VAN 5 µg	TGC 15 µg	LZD 10 µg	CHL 30 µg	RIF 5 µg	SXT 25 µg
1.	106	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
2.	159	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	S	S	R*	S	R	S	S	S	S	S	S
3.	176	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S
4.	202	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S
5.	204	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	S	S	R**	R	R	S	S	S	S	S	S
6.	213	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
7.	252	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
8.	260	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	S	S	R**	R	R	S	S	S	S	S	S
9.	279	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	S	S	R**	R	R	S	S	S	S	S	S
10.	282	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
11.	296	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	S	S	R**	R	R	S	S	S	S	S	S
12.	301	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	S	S	R*	S	S	S	S	S	S	S	S
13.	376	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
14.	387	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S
15.	430	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S
16.	464	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S
17.	468	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
18.	469	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
19.	475	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S
20.	515	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
21.	540	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S
22.	543	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
23.	588	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S
24.	598	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S
25.	634	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	S	S	R**	R	R	S	S	S	R	S	S
26.	638	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
27.	650	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
28.	652	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	S	S	R***	S	R	S	S	S	S	S	S
29.	662	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

30.	668	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
31.	773	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S
32.	2866	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S
33.	3674	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S
34.	5073	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S
35.	8402	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	S	S	R*	S	R	S	S	S	S	R	S
36.	26529	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S

PEN – penicylina, NOR – norfloksacyna, ERY – erytromycyna, CLI – klindamycyna, TET – tetracyklina, VAN – wankomycyna, TGC – tigecyklina, LZD – linezolid, CHL – chloramfenikol, RIF – rifampicyna, SXT – trimethoprim/sulfametoksazol, „R” – oporny, „S” – wrażliwy, “R*” – iMLS_B, “R**” – cMLS_B, “R***” – M-fenotyp MLS_B

A10C. Profil lekowrażliwości badanych szczepów *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae*.

Lp.	Numer szczepu	Gatunek	Nazwa antybiotyku i stężenie										
			PEN 1 µg	NOR 10 µg	ERY 15 µg	CLI 2 µg	TET 30 µg	VAN 5 µg	TGC 15 µg	LZD 10 µg	CHL 30 µg	RIF 5 µg	SXT 25 µg
1.	350	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>dysgalactiae</i>	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S
2.	367	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>dysgalactiae</i>	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S
3.	431	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>dysgalactiae</i>	S	S	R**	R	R	S	S	S	S	S	S
4.	435	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>dysgalactiae</i>	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S
5.	592	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>dysgalactiae</i>	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S

PEN – penicylina, NOR – norfloksacyna, ERY – erytromycyna, CLI – klindamycyna, TET – tetracyklina, VAN – wankomycyna, TGC – tigecyklina, LZD – linezolid, CHL – chloramfenikol, RIF – rifampicyna, SXT – trimethoprim/sulfametoksazol, „R” – oporny, „S” – wrażliwy, “R*” – iMLS_B, “R**” – cMLS_B, “R***” – M-fenotyp MLS_B

Tabela A10D. Profil lekowrażliwości badanych szczepów *S. gallolyticus*.

Lp.	Numer szczepu	Gatunek	Nazwa antybiotyku i stężenie									
			PEN 1 µg	AMP 2 µg	CXM 30 µg	FEP 30 µg	*NOR 10 µg	ERY 15 µg	CLI 2 µg	TET 30 µg	VAN 5 µg	*RIF 5 µg
1.	1275	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i>	S	S	S	S	R	S	S	R	S	S
2.	1836	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i>	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S
3.	2140	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i>	S	S	S	S	R	R**	R	R	S	S
4.	2185	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i>	S	S	S	S	R	R**	R	R	S	S
5.	2200	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i>	S	S	S	S	S	R**	R	R	S	S
6.	2205	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i>	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S
7.	3851	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i>	S	S	S	S	R	S	S	R	S	S
8.	4083	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	S	S	S	S	R	S	S	R	S	S
9.	5468	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i>	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S
10.	5469	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i>	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S
11.	5523	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i>	S	S	S	S	R	S	S	R	S	S

* - ze względu na brak rekomendacji oceniono wynik na podstawie rekomendacji dla paciorkowców grup A, B, C i G; PEN – penicylina, AMP – ampicylina, CXM – cefuroksym, FEP – cefepim, NOR – norfloksacyna, ERY – erytromycyna, CLI – klindamycyna, TET – tetracyklina, VAN – wankomycyna, RIF – rifampicyna, „R” – oporny, „S” – wrażliwy, “R*” – iMLS_B, “R**” – cMLS_B, “R***” – M-fenotyp MLS_B

Tabela A11A. Obecność genów oporności u szczepów badanych *S. uberis* i *S. parauberis*.

Lp.	Numer szczepu	Gatunek	Geny oporności															
			TETRACYKLINY				MAKROLIDY I MECHANIZM MLS _B				LINKOZAMIDY				FLUOROCHINOLONY		AMINOGLIKOZYDY	
			<i>tetK</i>	<i>tetL</i>	<i>tetM</i>	<i>tetO</i>	<i>tetS</i>	<i>ermA</i>	<i>ermB</i>	<i>ermC</i>	<i>ermTR</i>	<i>InuD</i>	<i>parC</i>	<i>gyrA</i>	<i>aad6</i>	<i>aphA</i>		
1.	15	<i>S. uberis</i>	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-		
2.	33	<i>S. uberis</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-		
3.	36	<i>S. uberis</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-		
4.	39	<i>S. uberis</i>	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-		
5.	43	<i>S. uberis</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-		
6.	70	<i>S. uberis</i>	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-		
7.	115	<i>S. uberis</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-		
8.	120	<i>S. uberis</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-		
9.	196	<i>S. uberis</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-		
10.	233	<i>S. uberis</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
11.	244	<i>S. uberis</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-		
12.	249	<i>S. parauberis</i>	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-		
13.	261	<i>S. parauberis</i>	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-		
14.	272	<i>S. uberis</i>	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-		
15.	273	<i>S. uberis</i>	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-		
16.	279	<i>S. uberis</i>	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-		
17.	310	<i>S. uberis</i>	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-		
18.	340	<i>S. uberis</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-		
19.	348	<i>S. uberis</i>	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-		
20.	351	<i>S. uberis</i>	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-		
21.	375	<i>S. uberis</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-		
22.	389	<i>S. uberis</i>	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-		
23.	395	<i>S. uberis</i>	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+		
24.	401	<i>S. uberis</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-		
25.	408	<i>S. uberis</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-		
26.	418	<i>S. uberis</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-		
27.	584	<i>S. uberis</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-		

Tabela A11B. Obecność genów oporności u badanych szczepów *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis*.

Lp.	Numer szczepu	Gatunek	Geny oporności																						
			TETRACYKLINY						MAKROLIDY I MECHANIZM MLS _B						LINKOZAMIDY			FLUOROCHINOLONY			AMINOGLIKOZYDY				
			<i>tetK</i>	<i>tetL</i>	<i>tetM</i>	<i>tetO</i>	<i>tetS</i>	<i>ermA</i>	<i>ermB</i>	<i>ermC</i>	<i>ermTR</i>	<i>lnuD</i>	<i>parC</i>	<i>gyrA</i>	<i>aad6</i>	<i>aphA</i>									
1.	106	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	
2.	159	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
3.	176	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-
4.	202	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
5.	204	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
6.	213	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7.	252	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8.	260	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9.	279	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10.	282	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
11.	296	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
12.	301	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
13.	376	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
14.	387	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
15.	430	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
16.	464	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
17.	468	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
18.	469	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-

Tabela A11C. Obecność genów oporności u badanych szczepów *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae*.

Lp.	Numer szczepu	Gatunek	Geny oporności																
			TETRACYKLINY					MAKROLIDY I MECHANIZM MLS _B					LINKOZAMIDY			FLUOROCHINOLONY		AMINOGLIKOZYDY	
			<i>tetK</i>	<i>tetL</i>	<i>tetM</i>	<i>tetO</i>	<i>tetS</i>	<i>ermA</i>	<i>ermB</i>	<i>ermC</i>	<i>ermTR</i>	<i>lnuD</i>	<i>parC</i>	<i>gyrA</i>	<i>aad6</i>	<i>aphA</i>			
1.	350	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>dysgalactiae</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
2.	367	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>dysgalactiae</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
3.	431	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>dysgalactiae</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+		
4.	435	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>dysgalactiae</i>	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+		
5.	592	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>dysgalactiae</i>	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-		

Tabela A11D. Obecność genów oporności u badanych szczepów *S. gallolyticus*.

Lp.	Numer szczepu	Gatunek	Geny oporności															
			TETRACYKLINY				MAKROLIDY I MECHANIZM MLS _B				LINKOZAMIDY			FLUOROCHINOLONY		AMINOGLIKOZYDY		
			<i>tetK</i>	<i>tetL</i>	<i>tetM</i>	<i>tetO</i>	<i>tetS</i>	<i>ermA</i>	<i>ermB</i>	<i>ermC</i>	<i>ermTR</i>	<i>lnuD</i>	<i>parC</i>	<i>gyrA</i>	<i>aad6</i>	<i>aphA</i>		
1.	1275	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i>	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-		
2.	1836	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-		
3.	2140	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i>	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+		
4.	2185	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i>	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+		
5.	2200	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i>	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-		
6.	2205	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i>	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-		
7.	3851	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i>	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
8.	4083	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+		
9.	5468	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i>	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
10.	5469	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i>	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
11.	5523	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i>	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		

Tabela A12. Właściwości biochemiczne badanych szczepów *S. pseudintermedius*.

Lp.	Numer szczepu	Gatunek	Rodzaj hemolizy	Rozkład tłuszczów		Rozkład białek	
				Obecność lipazy	Obecność lecytynazy	Obecność kazeinazy	Obecność żelatynazy
Szczepy izolowane z materiałów klinicznych od ludzi							
1.	SPL 1	<i>S. pseudintermedius</i>	β	+	-	+	-
2.	SPL 2	<i>S. pseudintermedius</i>	β	+	-	+	-
3.	SPL 3	<i>S. pseudintermedius</i>	β	+	-	+	-
4.	SPL 4	<i>S. pseudintermedius</i>	β	+	-	+	+
5.	SPL 5	<i>S. pseudintermedius</i>	β	+	-	+	-
6.	SPL 6	<i>S. pseudintermedius</i>	β	+	-	+	-
7.	SPL 7	<i>S. pseudintermedius</i>	β	+	-	+	-
Szczepy izolowane z materiałów klinicznych od zwierząt							
8.	SPZ 1	<i>S. pseudintermedius</i>	β	+	-	+	+
9.	SPZ 2	<i>S. pseudintermedius</i>	β	+	-	+	-
10.	SPZ 3	<i>S. pseudintermedius</i>	β	+	-	+	+
11.	SPZ 4	<i>S. pseudintermedius</i>	β	+	+	+	+
12.	SPZ 5	<i>S. pseudintermedius</i>	β	+	-	+	+
13.	SPZ 6	<i>S. pseudintermedius</i>	β	+	-	+	-
14.	SPZ 7	<i>S. pseudintermedius</i>	β	+	-	+	+

Tabela A13. Obecność genów kodujących czynniki warunkujące kolonizację u badanych szczepów *S. pseudintermedius*.

Lp.	Numer szczepu	Gatunek	Geny kodujące czynniki kolonizacji									
			<i>ebpS</i>	<i>spsE</i>	<i>spsL</i>	<i>spsO</i>	<i>spsP</i>	<i>spsQ</i>	<i>eno</i>	<i>coa</i>	<i>fnbA</i>	<i>icaD</i>
Szczepy izolowane z materiałów klinicznych od ludzi												
1.	SPL 1	<i>S. pseudintermedius</i>	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+
2.	SPL 2	<i>S. pseudintermedius</i>	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+
3.	SPL 3	<i>S. pseudintermedius</i>	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+
4.	SPL 4	<i>S. pseudintermedius</i>	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+
5.	SPL 5	<i>S. pseudintermedius</i>	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+
6.	SPL 6	<i>S. pseudintermedius</i>	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+
7.	SPL 7	<i>S. pseudintermedius</i>	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+
Szczepy izolowane z materiałów klinicznych od zwierząt												
8.	SPZ 1	<i>S. pseudintermedius</i>	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+
9.	SPZ 2	<i>S. pseudintermedius</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
10.	SPZ 3	<i>S. pseudintermedius</i>	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+
11.	SPZ 4	<i>S. pseudintermedius</i>	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
12.	SPZ 5	<i>S. pseudintermedius</i>	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+
13.	SPZ 6	<i>S. pseudintermedius</i>	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+
14.	SPZ 7	<i>S. pseudintermedius</i>	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+

Tabela A14. Obecność genów kodujących czynniki warunkujące toksyczność i inwazyjność u badanych szczepów *S. pseudintermedius*.

Lp.	Numer szczepu	Gatunek	Obecność Clumping Factor (CF)	Geny kodujące enterotoksyny		Geny kodujące toksyny eksfoliatywne			Geny kodujące leukotoksyny		Gen kodujący lipazę
				<i>sec</i>	<i>sed</i>	<i>siet</i>	<i>exiA</i>	<i>exiB</i>	<i>LukF</i>	<i>LukS</i>	<i>lip</i>
Szczepy izolowane z materiałów klinicznych od ludzi											
1.	SPL 1	<i>S. pseudintermedius</i>	+	-	-	+	-	-	+	+	+
2.	SPL 2	<i>S. pseudintermedius</i>	-	-	+	+	-	-	+	+	+
3.	SPL 3	<i>S. pseudintermedius</i>	-	-	-	+	+	-	+	+	+
4.	SPL 4	<i>S. pseudintermedius</i>	-	+	-	+	+	-	+	+	+
5.	SPL 5	<i>S. pseudintermedius</i>	+	-	-	+	-	-	+	+	+
6.	SPL 6	<i>S. pseudintermedius</i>	+	+	-	+	-	-	+	+	+
7.	SPL 7	<i>S. pseudintermedius</i>	+	+	+	+	-	+	+	+	+
Szczepy izolowane z materiałów klinicznych od zwierząt											
8.	SPZ 1	<i>S. pseudintermedius</i>	-	-	-	+	-	-	+	+	+
9.	SPZ 2	<i>S. pseudintermedius</i>	-	-	-	+	-	+	+	+	+
10.	SPZ 3	<i>S. pseudintermedius</i>	-	-	-	+	-	-	+	+	+
11.	SPZ 4	<i>S. pseudintermedius</i>	-	-	-	+	-	-	+	+	+
12.	SPZ 5	<i>S. pseudintermedius</i>	-	-	-	+	-	-	+	+	+
13.	SPZ 6	<i>S. pseudintermedius</i>	-	-	-	+	-	-	+	+	+
14.	SPZ 7	<i>S. pseudintermedius</i>	-	-	-	+	-	-	+	+	+

Tabela A15. Typy sekwencji i allele siedmiu loci dla badanych szczepów *S. pseudintermedius*.

Lp.	Numer szczepu	Gatunek	Oporność na metycylinę	Typ sekwencji (ST)	Loci i odpowiadające im allele						
					<i>ack</i>	<i>cpn60</i>	<i>fdh</i>	<i>pta</i>	<i>purA</i>	<i>sar</i>	<i>tuf</i>
Szczepy izolowane z materiałów klinicznych od ludzi											
1.	SPL 1	<i>S. pseudintermedius</i>	MSSP	813	1	21	1	2	5	1	1
2.	SPL 2	<i>S. pseudintermedius</i>	MSSP	241	1	21	4	1	23	1	1
3.	SPL 3	<i>S. pseudintermedius</i>	MSSP	954	1	2	2	20	18	1	1
4.	SPL 4	<i>S. pseudintermedius</i>	MSSP	599	5	29	2	1	5	1	1
5.	SPL 5	<i>S. pseudintermedius</i>	MSSP	1572	1	11	4	75	5	1	1
6.	SPL 6	<i>S. pseudintermedius</i>	MSSP	984	1	2	2	1	3	2	1
7.	SPL 7	<i>S. pseudintermedius</i>	MSSP	984	1	2	2	1	3	2	1
Szczepy izolowane z materiałów klinicznych od zwierząt											
8.	SPZ 1	<i>S. pseudintermedius</i>	MSSP	818	2	7	4	1	8	1	1
9.	SPZ 2	<i>S. pseudintermedius</i>	MSSP	1276	1	2	1	1	8	1	1
10.	SPZ 3	<i>S. pseudintermedius</i>	MSSP	338	1	10	2	4	2	1	1
11.	SPZ 4	<i>S. pseudintermedius</i>	MRSP	71	3	9	1	2	1	2	1
12.	SPZ 5	<i>S. pseudintermedius</i>	MSSP	1109	1	11	4	1	13	1	1
13.	SPZ 6	<i>S. pseudintermedius</i>	MSSP	1260	1	2	4	1	23	1	1
14.	SPZ 7	<i>S. pseudintermedius</i>	MRSP	71	3	9	1	2	1	2	1

MRSP – methicillin-resistant *S. pseudintermedius*, MSSP – methicillin-susceptible *S. pseudintermedius*

Tabela A16. Profil lekowrażliwości badanych szczepów *S. pseudintermedius*.

Lp.	Numer szczepu	Gatunek	Nazwa antybiotyku i stężenie													
			OXC 1 µg	CIP 5 µg	NOR 10 µg	GEN 10 µg	ERY 15 µg	CLI 2 µg	TET 30 µg	TGC 15 µg	SYN 15 µg	SXT 25 µg	LZD 10 µg	FA 10 µg	RIF 5 µg	
Szczepy izolowane z materiałów klinicznych od ludzi																
1.	SPL1	<i>S. pseudintermedius</i>	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S
2.	SPL2	<i>S. pseudintermedius</i>	S	S	S	S	R**	S	S	S	S	S	S	S	S	S
3.	SPL3	<i>S. pseudintermedius</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
4.	SPL4	<i>S. pseudintermedius</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
5.	SPL5	<i>S. pseudintermedius</i>	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
6.	SPL6	<i>S. pseudintermedius</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
7.	SPL7	<i>S. pseudintermedius</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Szczepy izolowane z materiałów klinicznych od zwierząt																
8.	SPZ1	<i>S. pseudintermedius</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
9.	SPZ2	<i>S. pseudintermedius</i>	S	R	R	R	R**	R	S	S	S	S	S	S	S	S
10.	SPZ3	<i>S. pseudintermedius</i>	S	R	R	R	R**	R	R	S	S	S	S	S	S	S
11.	SPZ4	<i>S. pseudintermedius</i>	R	R	R	R	R**	R	R	S	S	R	S	S	S	S
12.	SPZ5	<i>S. pseudintermedius</i>	S	S	S	S	R**	R	R	S	S	S	S	S	S	S
13.	SPZ6	<i>S. pseudintermedius</i>	S	S	S	S	R**	R	S	S	S	S	S	S	S	S
14.	SPZ7	<i>S. pseudintermedius</i>	R	R	R	R	R**	R	R	S	R	S	S	S	S	S

OXC – oksacyklina, CIP - ciprofloksacyna, NOR – norfloksacyna, ERY – erytromycyna, CLI – klindamycyna, TET – tetracyklina, TGC – tigecyklina, SYN – chinuprystyna/dalfoprystyna, SXT – suflametoksazol/trimetoprim, LZD – linezolid, FA – kwas fusydowy, RIF - rifampicyna, „R” – oporny, „S” – wrażliwy, R** - cMLS_B

Tabela A17. Obecność genów oporności na antybiotyki β -laktamowe u badanych szczepów *S. pseudintermedius*.

Lp.	Numer szczepu	Gatunek	Geny oporności	
			<i>blaZ</i>	<i>mecA</i>
Szczepy izolowane z materiałów klinicznych od ludzi				
1.	SPL 1	<i>S. pseudintermedius</i>	+	-
2.	SPL 2	<i>S. pseudintermedius</i>	+	-
3.	SPL 3	<i>S. pseudintermedius</i>	-	-
4.	SPL 4	<i>S. pseudintermedius</i>	+	-
5.	SPL 5	<i>S. pseudintermedius</i>	+	-
6.	SPL 6	<i>S. pseudintermedius</i>	-	-
7.	SPL 7	<i>S. pseudintermedius</i>	-	-
Szczepy izolowane z materiałów klinicznych od zwierząt				
8.	SPZ 1	<i>S. pseudintermedius</i>	+	-
9.	SPZ 2	<i>S. pseudintermedius</i>	+	-
10.	SPZ 3	<i>S. pseudintermedius</i>	+	-
11.	SPZ 4	<i>S. pseudintermedius</i>	+	+
12.	SPZ 5	<i>S. pseudintermedius</i>	+	-
13.	SPZ 6	<i>S. pseudintermedius</i>	+	-
14.	SPZ 7	<i>S. pseudintermedius</i>	+	+

15. Dorobek naukowy

15.1. Publikacje będące podstawą pracy doktorskiej

1. **Glajzner, P.**, Szewczyk, E. M., & Szemraj, M. (2021). Pathogenicity and drug resistance of animal streptococci responsible for human infections [Review]. *Journal of Medical Microbiology*, 70(3), 19, Article 001339. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.001339>

IF = 3,196

MNiSW = 70

2. **Glajzner, P.**, Szewczyk, E. M., & Szemraj, M. (2023). Pathogenic potential and antimicrobial resistance of *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from human and animals [Article; Early Access]. *Folia Microbiologica*, 13. <https://doi.org/10.1007/s12223-022-01007-x>

IF = 2,629

MNiSW = 40

3. **Glajzner, P.**, Szewczyk, E. M., & Szemraj, M. (2023). Phenotypic and genotypic characterization of antimicrobial resistance in streptococci isolated from human and animal clinical specimens. *Current Microbiology*, 80:228. <https://doi.org/10.1007/s00284-023-03337-6>

IF = 2,343

MNiSW = 40

15.2. Pozostały dorobek naukowy

15.2.1. Publikacje

1. **Glajzner, P.**, (2019). Zakażenia związane z opieką zdrowotną – ciągle poważny problem leczenia w Polsce, *Farmacja Polska*, vol. 75, no. 3, 2019, pp. 148-156, DOI:10.32383/farmpol/116288

MNiSW = 70

2. Szemraj, M., Lisiecki, P., **Glajzner, P.**, & Szewczyk, E. M. (2023). Vancomycin heteroresistance among methicillin-resistant clinical isolates *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. simulans*, and *S. warneri* [Article]. *Brazilian Journal of Microbiology*, 54(1), 159-167. <https://doi.org/10.1007/s42770-022-00870-7>

IF = 2,214

MNiSW = 70

15.2.2. Doniesienia zjazdowe

1. Satała J., **Glajzner P.**, Lisiecki P.: Bakteriocynty bakterii z rodzaju *Enterococcus*, In: I Sesja Młodych Mikrobiologów Środowiska Łódzkiego, 2017, [b.w.], pp. 22-22
2. Satała J., **Glajzner P.**, Lisiecki P.: Bakteriocynty bakterii z rodzaju *Enterococcus*, In: XXII Sympozjum Naukowe "Postępy w Medycynie Zakażeń", 2018, [b.w.], pp. 22-23
3. **Glajzner P.**, Lisiecki P.: Zakażenia szpitalne w Polsce i innych krajach europejskich - przegląd piśmiennictwa, In: III Sesja Młodych Mikrobiologów Środowiska Łódzkiego, 2019, [b.w.], pp. 1-41

4. Rubin N., **Glajzner P.**, Szemraj M.: Czynniki wirulencji bakterii z rodzaju Streptococcus izolowanych od ludzi, In: V Sesja Młodych Mikrobiologów Środowiska Łódzkiego. Książka abstraktów, Article number: MM-4, **2022**, Uniwersytet Łódzki, pp. 18-18
5. **Glajzner P.**, Szemraj M. : Ocena czynników etiologicznych zapalenia wymion u krów z powiatu sieradzkiego, In: V Sesja Młodych Mikrobiologów Środowiska Łódzkiego. Książka abstraktów, Article number: MM-9, **2022**, Uniwersytet Łódzki, pp. 23-23
6. **Glajzner P.**, Szemraj M. : Streptococcus uberis – patogen zwierzęcy czy także ludzki, In: XXIX Zjazd Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów. Materiały Zjazdowe, sesja 16, Article number: 0061, **2022**, Warszawa
7. Grędysa M., Chruścicka A., **Glajzner P.**, Szemraj M., Sienkiewicz M. : Identyfikacja genetyczna oraz wykrywanie genów oporności na makrolidy, linkozamidy i streptograminy B u gronkowców koagulazoujemnych izolowanych z materiałów klinicznych, In: VI Sesja Młodych Mikrobiologów Środowiska Łódzkiego, Książka abstraktów, Article number: MM-7, **2023**, Uniwersytet Medyczny w Łodzi
8. Nowowiejski D., **Glajzner P.**, Szemraj M., Sienkiewicz M. : Typowanie kaset SCCmec u szczepów Staphylococcus hominis opornych na metycylinę, In: VI Sesja Młodych Mikrobiologów Środowiska Łódzkiego, Książka abstraktów, Article number: MM-17, **2023**, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

16. Oświadczenia współautorów



Załącznik nr 7
do Regulaminu postępowania w sprawie nadania stopnia doktora
w Uniwersytecie Medycznym w Łodzi

Łódź, 27.06.2023 r.

Paulina Głajzner
(imię i nazwisko Kandydata)

PRZEWODNICZĄCY RADY NAUKOWEJ
DYSCYPLINY / UNIwersYTETU*

OŚWIADCZENIE

Współautorów określające ich wkład w powstanie artykułu lub monografii¹

Oświadczam, że mój udział w następującej pracy²:

Głajzner, P., Szewczyk, E. M., & Szemraj, M. (2021).

Pathogenicity and drug resistance of animal streptococci responsible for human infections [Review].

Journal of Medical Microbiology, 70(3), 19, Article 001339

<https://doi.org/10.1099/jmm.0.001339>

przedstawia się jak poniżej:

Autor	Udział %	Opis udziału własnego	Podpis
Mgr farm. Paulina Głajzner	70	Opracowanie koncepcji, zebranie danych, napisanie i przygotowanie manuskryptu.	
Prof. dr hab. n. farm. Eligia M. Szewczyk	20	Nadzór merytoryczny. Współudział w redakcji i korekta manuskryptu.	
Dr n. farm. Magdalena Szemraj	10	Współudział w przygotowaniu i korektach manuskryptu jako autor korespondencyjny.	

¹ W przypadku, gdy dorobek stanowi autorstwo dwóch lub więcej osób

² Należy wskazać: autorów, tytuł, czasopismo, rok wydania, tom, strony

Łódź, 27.06.2023 r.

Paulina Glajzner
(imię i nazwisko Kandydata)

PRZEWODNICZĄCY RADY NAUKOWEJ
DYSCYPLINY / UNIWERSYTETU*

OŚWIADCZENIE

Współautorów określające ich wkład w powstanie artykułu lub monografii¹

Oświadczam, że mój udział w następującej pracy²:



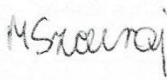
Glajzner, P., Szewczyk, E. M., & Szemraj, M. (2023)

Phenotypic and genotypic characterization of antimicrobial resistance in streptococci isolated from human and animal clinical specimens [Short Communication].

Current Microbiology, 80:228

<https://doi.org/10.1007/s00284-023-03337-6>

przedstawia się jak poniżej:

Autor	Udział %	Opis udziału własnego	Podpis
Mgr farm. Paulina Glajzner	70	Koncepcja badań, wykonanie badań, analiza i interpretacja wyników, opracowanie manuskryptu.	
Prof. dr hab. n. farm. Eligia M. Szewczyk	20	Współudział w opracowaniu dyskusji. Nadzór merytoryczny, korekta manuskryptu.	
Dr n. farm. Magdalena Szemraj	10	Konsultacje merytoryczne, współudział w korekcie manuskryptu jako autor korespondencyjny.	

¹ W przypadku, gdy dorobek stanowi autorstwo dwóch lub więcej osób

² Należy wskazać: autorów, tytuł, czasopismo, rok wydania, tom, strony

Łódź, 27.06.2023 r.

Paulina Glajzner
(imię i nazwisko Kandydata)

**PRZEWODNICZĄCY RADY NAUKOWEJ
DYSCYPLINY / UNIWERSYTETU***

OŚWIADCZENIE

Współautorów określające ich wkład w powstanie artykułu lub monografii¹

Oświadczam, że mój udział w następującej pracy²:


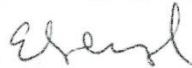

Glajzner, P., Szewczyk, E. M., & Szemraj, M. (2023).

Pathogenic potential and antimicrobial resistance of *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from human and animals [Article]

Folia Microbiologica, 13.

<https://doi.org/10.1007/s12223-022-01007-x>

przedstawia się jak poniżej:

Autor	Udział %	Opis udziału własnego	Podpis
Mgr farm. Paulina Glajzner	70	Współtworzenie koncepcji, wykonanie badań, analiza i interpretacja wyników, opracowanie manuskryptu.	
Prof. dr hab. n. farm. Eligia M. Szewczyk	20	Współtworzenie koncepcji, nadzór merytoryczny, korekta dyskusji.	
Dr n. farm. Magdalena Szemraj	10	Analiza wyników, konsultacje merytoryczne, współudział w przygotowaniu i korektach manuskryptu jako autor korespondencyjny.	

¹ W przypadku, gdy dorobek stanowi autorstwo dwóch lub więcej osób

² Należy wskazać: autorów, tytuł, czasopismo, rok wydania, tom, strony