

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Studijní program:

Biologie

Studijní obor:

Biologie



Lucie Kubištová

SCCmec a jiné mobilní genetické elementy spojené s rezistencí k meticilinu u
stafylokoků

SCCmec and other mobile genetic elements associated with methicillin
resistance in staphylococci

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Irena Lichá, CSc.

Praha, 2013

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 13. května 2013

.....

Chtěla bych poděkovat RNDr. Ireně Liché, CSc. za odbornou pomoc, cenné rady a trpělivost při vedení bakalářské práce. Dále děkuji za podporu Martinu Zoulovi a mé rodině.

Obsah

Abstrakt

Abstract

Seznam použitých zkratk

1. Úvod.....	1
2. Charakteristika kmenů <i>Staphylococcus</i>	2
2.1. Taxonomie	2
2.2. Patogenita stafylokoků	2
2.2.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	2
2.2.2. Koaguláza-negativní stafylokoky	3
3. Rezistence k meticilinu	3
3.1. Stafylokoky rezistentní k meticilinu	4
4. Unikátní mobilní genetický element – stafylokoková chromozomová kazeta <i>SCCmec</i>	5
4.1. Stavba <i>SCCmec</i>	5
4.1.1. <i>mec</i> komplex	5
4.1.2. <i>ccr</i> komplex	7
4.1.3. J oblasti	8
4.2. Klasifikace <i>SCCmec</i>	8
4.2.1. <i>SCCmec</i> typu I.....	9
4.2.2. <i>SCCmec</i> typu II.....	9
4.2.3. <i>SCCmec</i> typu III.....	9
4.2.4. <i>SCCmec</i> typu IV	10
4.2.5. <i>SCCmec</i> typu V	10
4.2.6. <i>SCCmec</i> typu VI	10
4.2.7. <i>SCCmec</i> typu VII	11
4.2.8. <i>SCCmec</i> typu VIII	11
4.2.9. <i>SCCmec</i> typu IX.....	11
4.2.10. <i>SCCmec</i> typu X.....	11
4.2.11. <i>SCCmec</i> typu XI.....	11
5. Rozšíření typů <i>SCCmec</i>	13
6. Původ a molekulární evoluce <i>SCCmec</i>	15

6.1.	Původ <i>mec</i> komplexu	15
6.2.	Původ <i>SCCmec</i>	16
7.	Horizontální přenos <i>SCCmec</i> a <i>mecA</i>	18
7.1.	Transformace	19
7.2.	Transdukce	20
7.3.	Konjugace.....	21
8.	Multirezistentní kmeny stafylokoků spojené s rezistencí k meticilinu	21
9.	Závěr	23

Abstrakt

Stafylokoky jsou běžnou součástí lidské flóry, ale jsou také nebezpečnými patogeny. Mezi stafylokoky je velmi rozšířená rezistence k meticilinu. Za rezistenci k meticilinu je odpovědný gen *mecA* uspořádaný do *mec* komplexu, který je součástí mobilního genetického elementu – stafylokokové chromozomové kazety *SCCmec*. *SCCmec* je rozsáhlý variabilní mobilní genetický element, je vždy tvořen třemi částmi, kterými jsou *mec* komplex, *ccr* komplex a *J* oblasti. Komplex *mec* obsahuje gen *mecA* a jeho regulační geny *mecR1* a *mecI*. Komplex *ccr* kóduje geny pro rekombinázy, které jsou odpovědné za vystřížení a vložení *SCCmec* kazety. *J* oblasti jsou zbývající části *SCCmec* kazet, které obsahují další mobilní genetické elementy, ty mají buď přímý vliv na expresi genů pro rezistenci k meticilinu, nebo nesou geny pro rezistenci k jiným antimikrobiálním látkám. Celá kazeta nebo její součásti se mohou rozšiřovat horizontálním přenosem genů mezi stafylokoky stejného druhu i mezidruhově, i když mechanismus přenosu je stále nejasný. V současnosti je popsáno celkem jedenáct typů *SCCmec* kazet. V této práci jsem shrnula poznatky o molekulárním složení *SCCmec*, horizontálním přenosu genů odpovědných za rezistenci k meticilinu a molekulární evoluci *SCCmec*. Mobilní genetické elementy hrají klíčovou roli pro evoluci a adaptaci bakterií. Porozumění těmto mechanismům je důležité pro kontrolu dalšího šíření meticilin-rezistentních kmenů.

Klíčová slova: *SCCmec*, horizontální přenos, mobilní genetické elementy, MRSA, *Staphylococcus* sp.

Abstract

Staphylococci are common part of human flora but also they are a dangerous pathogen. Among staphylococci strains, methicillin resistance is widespread. The *mecA* gene, organized in *mec* complex, is responsible for methicillin resistance. The *mec* complex is part of mobile genetic element – staphylococcal chromosome cassette *SCCmec*. *SCCmec* is large variable mobile genetic element and it is always composed of three parts – *mec* complex, *ccr* complex and J regions. Complex *mec* consists of *mecA* gene and its regulatory genes *mecR1* and *mecI*. Complex *ccr* encodes recombinase genes, they are responsible for excision and insertion of *SCCmec*. J regions are remaining parts of *SCCmec*, which include other mobile genetic elements that directly influence methicillin resistance genes expression or carry genes for resistance to other antimicrobial agents. *SCCmec* or its parts can be transferred by horizontal gene transfer between staphylococci both intraspecific and interspecific, although mechanism of its transfer is still unknown. Eleven types of *SCCmec* have been described so far. In this thesis, I summarized the findings about molecular composition of *SCCmec*, horizontal gene transfer of the genes encoding methicillin resistance and molecular evolution of *SCCmec*. Mobile genetic elements play a key role in evolution and adaptation of bacteria. Understanding of these mechanisms is important for control of methicillin resistance spread.

Key words: *SCCmec*, horizontal transfer, mobile genetic elements, MRSA, *Staphylococcus* sp.

Seznam použitých zkratek

	Anglický název	Český název/překlad
<i>attBSCC</i>	bacterial chromosomal attachment site	specifické místo na bakteriálním chromozomu pro včlenění SCC
bp	base pair	páry bazí
CA-MRSA	community-acquired methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>	metilicilin rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i> získaný ve společnosti
CoNS	coagulase-negative staphylococcus	koaguláza-negativní stafylokok
CoPS	coagulase-positive staphylococcus	koaguláza-pozitivní stafylokok
DNA	deoxyribonucleic acid	deoxyribonukleová kyselina
HA-MRSA	hospital-acquired methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>	metilicilin rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i> získaný v nemocnici
HIV	human immunodeficiency virus	virus lidské imunitní nedostatečnosti
IS	insertion sequence	inzerční sekvence
kb	kilobase	kilobazí
MGE	mobile genetic elements	mobilní genetické elementy
MR-CoNS	methicillin-resistant coagulase-negative staphylococcus	metilicilin rezistentní koaguláza-negativní stafylokok
MRSA	methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>	metilicilin rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>
MRSE	methicillin-resistant <i>Staphylococcus epidermidis</i>	metilicilin rezistentní <i>Staphylococcus epidermidis</i>
MSSA	methicillin-susceptible <i>Staphylococcus aureus</i>	metilicilin citlivý <i>Staphylococcus aureus</i>
PBP	penicillin-binding protein	penicilin-vázající protein
PVL	Panton-Valentine leukocidin	Panton-Valentinův leukocidin
SCC <i>mec</i>	staphylococcal cassette chromosome <i>mec</i>	stafylokoková chromozomová kazeta <i>mec</i>

1. Úvod

Éra antibiotik začala v roce 1928 objevením penicilinu a pokračovala od 40. let 20. století jeho používáním v klinické praxi. Záhy po zavedení antibiotik pro léčbu infekčních onemocnění se začaly vyskytovat první rezistentní kmeny. I když některé kmeny získaly rezistenci mutací v jejich genomu, za šíření další a dalších rezistentních kmenů mohou hlavně mobilní genetické elementy nesoící geny pro různé antibiotikové rezistence a jejich schopnost šířit se horizontálním přenosem mezi jedinci stejného druhu i mezidruhově. Právě selekční tlak antibiotik urychlil evoluci těchto elementů.

Mezi první infekce léčené penicilinem patřily také ty způsobené bakteriemi rodu *Staphylococcus*. U nich se poměrně rychle vyvinula rezistence na téměř všechna β -laktamová antibiotika tím, že získaly gen pro β -laktamázu, která štěpí β -laktamový kruh těchto antibiotik. Proto byl v r. 1959 zaveden meticilin, který byl k tomuto enzymu odolný. Rezistence na meticilin byla objevena v klinických izolátech z nemocnic severovýchodní Anglie v r. 1961 (Jevons, 1961). Významný patogen *Staphylococcus aureus* získal rezistenci k meticilinu integrací chromosomové kazety *SCCmec*, která nese mimo jiné gen *mecA* kódující přídavný penicilin-vázající protein PBP2a, který je zodpovědný za rezistenci k meticilinu. Zdroj tohoto elementu není zatím známý. Kazeta *SCCmec* je rozšířená i mezi koaguláza-negativními stafylokoky, u kterých se předpokládá, že by mohly být původcem tohoto elementu. I když se nyní meticilin v klinické praxi aplikuje jen zřídka, je nutné stále sledovat a zkoumat kmeny rezistentní na meticilin, jelikož meticilin rezistentní *Staphylococcus aureus* má schopnost přijímat a akumulovat další determinanty rezistence, hrozí tak nebezpečí vzniku multirezistentních klonů stafylokoků, u kterých bude velice omezená možnost léčby.

V této práci bych se chtěla zaměřit především na molekulární aspekty rezistence k meticilinu, shrnout poznatky o vzniku a šíření rezistence mezi stafylokoky, o stavbě mobilních genetických elementů odpovědných za tuto rezistenci. Právě porozumění mechanismům rezistence na molekulární úrovni je klíčové pro další boj proti vzniku a šíření multirezistentních kmenů, které by mohly velmi zkomplikovat léčbu bakteriálních infekcí.

2. Charakteristika kmenů *Staphylococcus*

Stafylokoky patří mezi grampozitivní koky, které se shlukují nejčastěji do typických hroznovitých útvarů. Jsou nepohyblivé, a i když netvoří spory, jsou dosti odolné vůči vnějším podmínkám. Jejich velikost se v průměru pohybuje kolem 0,8 μm . Ve vztahu ke kyslíku jsou fakultativně anaerobní. Jsou to chemoorganotrofové s respiračním nebo fermentativním metabolismem, jako zdroj uhlíku využívají různé cukry nebo aminokyseliny, hlavní konečné produkty jsou CO_2 a kyselina octová. Všechny druhy stafylokoků, kromě dvou anaerobních druhů, produkují katalázu. Jsou mezofilní, jejich teplotní optimum pro růst se pohybuje kolem 37°C. Většina druhů je nepatogenních, jsou součástí normální flóry kůže a sliznic u lidí i zvířat, některé druhy ale mohou způsobovat lehké i těžké infekce, zvláště pak u imunodeficientních jedinců.

2.1. Taxonomie

Rod *Staphylococcus* se taxonomicky řadí do říše *Bacteria* oddělení *Firmicutes*, třídy *Bacilli*, řádu *Bacillales* a čeledě *Staphylococcaceae*. Do současné doby bylo popsáno 56 druhů stafylokoků, včetně poddruhů. Zpráva o objevu zatím posledního druhu byla publikována 1. března tohoto roku v IJSEM (Bel et al., 2013). Dnes se pro určení taxonomie na základě fylogenetické analýzy stanovuje podobnost sekvencí 16S rRNA a některých provozních genů, tzv. multilokusová sekvenční analýza (Ghebremedhin et al., 2008). Tradičně se stafylokoky rozděluje podle schopnosti produkovat koagulázu, enzym, který způsobuje srážení krve. Mezi koaguláza-pozitivní (CoPS) patří 8 druhů, mezi ně i nejvýznamnější *Staphylococcus aureus*, ostatní druhy jsou koaguláza-negativní (CoNS).

2.2. Patogenita stafylokoků

2.2.1. *Staphylococcus aureus*

S. aureus je běžnou součástí lidské flóry kůže a měkkých tkání, zvláště pak nosí sliznice. Pokud je ale tato přirozená bariéra porušena, ať už lehkým poraněním kůže nebo chirurgickým zákrokem, stafylokok vstoupí do organismu a stává se patogenem. Stafylokokovou infekcí jsou více ohroženi imunitně oslabení jedinci. Je typickým

nozokomiálním patogenem. Průběh onemocnění závisí na interakci obranných mechanismů hostitele a faktorů virulence bakterie. Proto *S. aureus* způsobuje široké spektrum onemocnění, od lehkých po těžké infekce kůže a měkkých tkání (Hanakawa et al., 2002; Miller et al., 2005; Patil et al., 2006), až ke generalizovaným infekcím, jako je například syndrom toxického šoku (Kashiwada et al., 2012) a bakteriémie (von Eiff et al., 2001). Pokud se tedy bakterie dostane do krevního řečiště, pacient je ohrožen sepsí, která může propuknout v septický šok. *S. aureus* napadá i vnitřní orgány a způsobuje závažná onemocnění jako například endokarditidu (Fowler et al., 2005) nebo nekrotizující pneumonii (Garnier et al., 2006).

2.2.2. Koaguláza-negativní stafylokoky

CoNS jsou také běžnou součástí lidské flóry kůže a sliznic. Na rozdíl od *S. aureus* jsou patogenní pouze pro imunodeficientní jedince, jako jsou například lidé nakaženi virem HIV. Dále jsou ohroženi novorozenci, intravenózní uživatelé drog a dlouhodobě hospitalizovaní pacienti. Výjimku tvoří pouze infekce močových cest způsobená bakterií *S. saprophyticus* (Higashide et al., 2008) a endokarditida, za kterou je nejčastěji zodpovědný *S. epidermidis* (Zinkernagel et al., 2005). Tato onemocnění se vyskytují i u imunokompetentních jedinců. U imunitně oslabených osob jsou CoNS kmeny odpovědné za podobně širokou škálu onemocnění, jakou způsobuje *S. aureus*. Jsou to mimo jiné infekce spojené s implantací cizího tělesa, například při opakované dialýze (Monsen et al., 2000), bakteriémie (Costa et al., 2006) a endoftalmitida (Karacal et al., 2007).

3. Rezistence k met icilinu

Meticilin je β -laktamové úzkospektré polosyntetické antibiotikum. Je odolný vůči působení β -laktamázy, proto se v roce 1959 začal užívat pro léčbu kmenů rezistentních k penicilinu. Jenže krátce po zavedení met icilinu do klinické praxe, v roce 1961, se v Anglii objevili první rezistentní kmeny met icilin-rezistentní *S. aureus* (MRSA) (Jevons, 1961).

Jako všechna β -laktamová antibiotika, met icilin je baktericidní tím, že inhibuje biosyntézu peptidoglykanu. Cílový protein met icilinu je penicilin-vázající protein PBP. PBP obsahuje doménu s transpeptidázovou aktivitou, která tvoří křížové peptidové vazby mezi řetězci peptidoglykanu (Sauvage et al., 2008). Transpeptidázová aktivita je inhibována tak, že se

otevře β -laktamový prstence antibiotika a vytvoří kovalentní vazbu se serinem v aktivním místě enzymu PBP (Chambers et al., 1994). Po podání tohoto antibiotika tedy dochází k rozrušení buněčné stěny a k lýzi bakterie.

Mechanismus rezistence byl odhalen v roce 1981 objevením přídatného penicilin vázajícího proteinu PBP2a u MRSA (Hartman and Tomasz, 1981). PBP2a je kódován genem *mecA*, který je většinou součástí mobilního genetického elementu *SCCmec* začleněného do chromozomu meticilin-rezistentních kmenů. *SCCmec* je jediný nalezený vektor pro *mecA*, gen pro rezistenci k meticilinu se nevyskytuje na žádném jiném mobilním genetickém elementu (MGE), *mecA* je jediný determinant způsobující rezistenci k meticilinu. *SCCmec* není původní součást chromozomu *S. aureus*, ale byla získána horizontálním přenosem. Gen *mecA* kóduje přídatný penicilin-vázající protein PBP2a, který nahrazuje transpeptidázovou aktivitu domény proteinu PBP2 a ve spolupráci s transglykozyázovou doménou tohoto přirozeného PBP2 zodpovídá za biosyntézu buněčné stěny (Pinho et al., 2001). Tento přídatný PBP2a má nízkou afinitu k β -laktamovým antibiotikům, takže tato antibiotika ho neinhibují.

3.1. Stafylokoky rezistentní k meticilinu

Meticilin rezistentní stafylokoky jsou ty, jejichž genom obsahuje gen *mecA*, který je u klinicky významných druhů stafylokoků součástí kazety *SCCmec*, u některých druhů stafylokoků se gen *mecA* může vyskytovat v chromozomu bakterie samostatně, nemusí být součástí *SCC*. Z klinického hlediska nejvýznamnější nositel tohoto elementu, meticilin-rezistentní *S. aureus*, je jediný zástupce CoPS, u kterého byla zjištěna rezistence k meticilinu. Právě u MRSA byl gen podmiňující tuto rezistenci poprvé objeven a zkoumán, nejprve jako tzv. přídatná DNA (Beck et al., 1986). *SCCmec* je rozšířená i mezi CoNS. Nejběžnější meticilin-rezistentní koaguláza-negativní stafylokok (MR-CoNS) je *S. epidermidis*, následuje *S. haemolyticus*, *S. hominis*, dále například *S. cohnii*, *S. capitis* a další (Garza-González et al., 2010; Lebeaux et al., 2012; Mombach Pinheiro Machado et al., 2007).

4. Unikátní mobilní genetický element – stafylokoková chromozomová kazeta *SCCmec*

4.1. Stavba *SCCmec*

Jak již bylo poznamenáno výše, ústřední genetický element podmiňující existenci meticilin rezistentních kmenů je stafylokoková chromozomová kazeta *SCCmec*, jejíž součástí je gen *mecA* kódující protein PBP2a. *SCCmec* je relativně velký fragment DNA, jeho velikost se pohybuje v rozmezí od 21 kb do 53 kb. Jedná se o unikátní mobilní genetický element vyskytující se pouze u stafylokoků. Stafylokokové kazety existují i jako mobilní element pro jiné geny než *mecA*, tyto kazety se nazývají SCC non-*mec* (Luong et al., 2002; Mongkolrattanothai et al., 2004). SCC se integruje do specifické sekvence *attBSCC* v unikátním místě chromozomu, které se nachází v blízkosti počátku replikace na 3' konci genu *orfX*, otevřeného čtecího rámce, jehož funkce byla do nedávné doby neznámá. V roce 2013 bylo zjištěno, že *orfX* kóduje metyltransferázu, jejíž exprese není inzercí kazety ovlivněna (Boundy et al., 2013). Tento *orfX* je lokalizován v blízkosti počátku replikace chromozomu *oriC* (Ito et al., 1999, 2001). *SCCmec* ohraničují zprava i zleva 15 bp přímé repetice, které jsou nezbytné pro pohyb elementu pomocí rekombinázy Ccr (Katayama et al., 2000). I když existují různé typy *SCCmec* elementu, všechny sdílejí stejnou sestavu několika genů, která zahrnuje *mecA* komplex, komplex genů pro rekombinázy *ccr* a 3 variabilní oblasti sousedící s *mec* a *ccr* komplexy, kterým se říká J oblasti (joining regions – spojovací oblasti).

Vzhledem k velké diverzifikovanosti *SCCmec* bylo potřeba určit konkrétní pravidla pro klasifikaci *SCCmec* elementů. Proto byla založena mezinárodní pracovní skupina pro klasifikaci SCC elementů (International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome Elements IWG-SCC), která postulovala pravidla klasifikace *SCCmec* do typů a podtypů a *mec* a *ccr* komplexů do tříd. Podle jimi určeného klíče se klasifikují i nově objevené *SCCmec*. Aktuální informace o klasifikaci *SCCmec* jsou k nalezení na webových stránkách této skupiny (<http://www.sccmec.org/>).

4.1.1. *mec* komplex

Komplex *mec* zahrnuje gen *mecA* proti směru transkripce orientované regulační geny *mecR1*, který funguje jako transduktor signálu, a *mecI*, který má funkci represoru. Vliv

represoru *mecI* na expresi *mecA* a tedy i na míru rezistence k meticilinu byl potvrzen jeho inaktivací. Kmeny MRSA, v jejichž genomu byl tento gen inaktivován, se staly k meticilinu plně rezistentní (Kuwahara-Arai et al., 1996). Podle rozdílné struktury v oblastí genů *mecI-mecR1* bylo klasifikováno pět (A-E) tříd *mec* komplexu (Katayama et al., 2001; Shore et al., 2011). Třídy A-D jsou znázorněny na obrázku č.1, třída E je znázorněna na obrázku č.4.

V *mec* komplexu se dále nacházejí dva typy inzerčních sekvencí. IS431 se nachází ve všech typech *mec* komplexu, po směru transkripce *mecA* v blízkosti *orfX* (Katayama et al., 2001). V některých *mec* komplexech se navíc nachází ještě druhá inzerční sekvence, IS431 nebo IS1272. Obě jsou významné pro expresi *mecA* genu, IS431 způsobuje delecí represoru *mecI* v *mec* komplexech třídy C, IS1272 v komplexu třídy B. Tím dereprimují expresi *mecA* genu, který se pak může plně transkribovat (Kobayashi et al., 2001). Ohraničuje tedy celý *mec* komplex. IS431 obsahuje dva otevřené čtecí rámce, které by podle nukleotidové sekvence mohly kódovat transponázu (Barberis-Maino et al., 1990), IS1272 obsahuje dva otevřené čtecí rámce o neznámé funkci (Archer et al., 1996). Komplex *mec* ohraničený inzerčními sekvencemi má tedy strukturu kompozitního transpozonu, jeho funkce však nebyla potvrzena. Lze se jen domnívat, že inzerční sekvence měly význam v prvotním začlenění *mec* komplexu do SCC a poté byla schopnost transpozice ztracena.

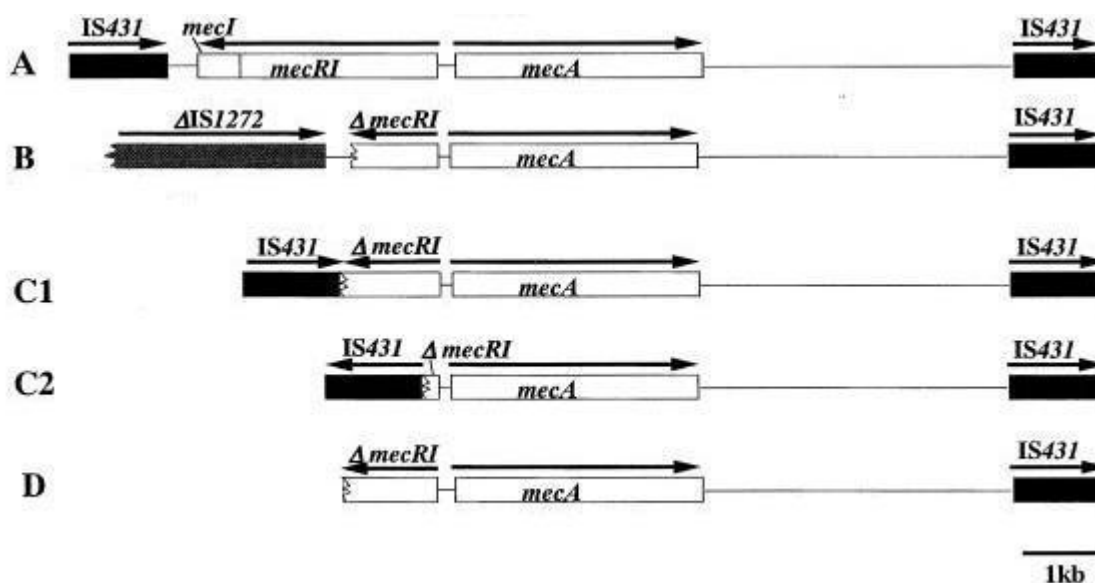
Předpokládá se, že nejpůvodnější je třída A (IS431-*mecA-mecR1-mecI*), třídy B-D byly od této struktury odvozeny. Pouze tato třída obsahuje nepřerušené geny pro regulační proteiny genu *mecA*, má funkční silný represor transkripce *mecI*. Kmeny, tzv. pre-MRS, které obsahují element s touto třídou *mec* komplexu, vykazují pouze nízké hodnoty rezistence k meticilinu (Hiramatsu et al., 1992). Bylo ale zjištěno, že některé kmeny obsahující SCC*mec* s *mec* komplexem třídy A jsou k meticilinu rezistentní stejně jako kmeny s delecí *mecI* represoru. Tyto kmeny mají navíc třetí regulační gen *mecR2*, což je anti-represor odpovědný za proteolytické štěpení represoru *mecI* (Arede et al., 2012).

V *mec* komplexu třídy B (IS431-*mecA-mecR1-IS1272*) jsou geny *mecI* a částečně 3'konec *mecR1* přerušeny vloženou sekvencí IS1272.

Třída C se dělí na dva podtypy, C1 a C2 (IS431-*mecA-mecR1-IS431*), obecnou strukturu mají oba podtypy identickou. Rozdíl je v tom, že třída C2 obsahuje rozsáhlejší delecí genu *mecR1* než třída C1. Podtypy mají jinou orientaci IS431 elementů, v C1 jsou IS431 uspořádány ve stejném směru, v C2 jsou uspořádány v opačné orientaci.

Třída D (*IS431-mecA-mecR1*) byla nalezena pouze u *S. caprae*. Regulační gen *mecR1* obsahuje částečnou delecí, inzerční sekvence odpovědná za tuto delecí byla nejspíš v průběhu evoluce ztracena. Komplex třídy D nemá strukturu kompozitního transpozonu, to může vysvětlovat konzervovanost této struktury pouze u *S. caprae*, ztráta druhého IS elementu nejspíš znemožnila tomuto komplexu pohyb.

Třída E (*blaZ-mecA-mecR1-mecI*) byla objevena v nedávné době a je zatím poslední třídou, která byla identifikována. Kmeny nesoucí tuto třídu *mec* komplexu, respektive typ *SCCmec* s tímto komplexem, vykazují rezistentní fenotyp, i když represor transkripce není přerušen. Všechny dříve objevené geny *mec* komplexu byly sekvenčně téměř identické, tyto ale vykazují pouze 62%, 45% a 66% totožnost s dříve publikovanými sekvencemi aminokyselin těchto genů. Tento komplex není ohraničen inzerčními sekvencemi, jako je tomu u ostatních tříd *mec* komplexů. Bylo navrženo, že tato třída by mohla tvořit samostatnou vývojovou větev. V *mec* komplexu je navíc zahrnut gen *blaZ*, který kóduje gen pro β -laktamázu. (Shore et al., 2011).



Obr.1 Schéma organizace tříd *mec* komplexů A-D (převzato z Katayama et al., 2001). Šipky naznačují směr transkripce. Třída E je znázorněna níže na obrázku č.4, v rámci *SCCmec* elementu typu XI.

4.1.2. *ccr* komplex

Komplex genů *ccr* je další nepostradatelná součást *SCCmec*. Enzymy Ccr jsou nezbytné pro pohyb *SCCmec* komplexu, i když mechanismus tohoto pohybu zatím není znám. Komplex

ccr se skládá z jednoho nebo dvou genů *ccr* a okolních otevřených čtecích rámců, které mají většinou neznámou funkci. Gen *ccr* kóduje DNA rekombinázy z rodiny invertáz-resolváz, tedy enzymy, které katalyzují místně specifické vystřižení a integraci SCC*mec* elementu (Katayama et al., 2000). Katalytický zbytek serinu v aktivním místě rekombinázy je konzervovaný ve všech Ccr proteinech (Ito et al., 2001). Byly odlišeny tři fylogeneticky rozdílné geny, *ccrA*, *ccrB* a *ccrC*, přičemž *ccrA* i *ccrB* se vyskytují v několika alotypech, *ccrC* pouze v jednom. K dnešnímu dni bylo identifikováno celkem 8 typů komplexu *ccr*, které jsou tvořeny různými kombinacemi alotypů *ccr* genů. Jsou to typ 1 (*ccrA1B1*), typ 2 (*ccrA2B2*), typ 3 (*ccrA3B3*), typ 4 (*ccrA4B4*), typ 5 (*ccrC1*), typ 6 (*ccrA5B3*), typ 7 (*ccrA1B6*) a typ 8 (*ccrA1B3*) (IWG-SCC, 2009) (<http://www.sccmec.org/>).

Při hledání fylogenetického vztahu Ccr rekombináz zahrnutých v SCC*mec* byla nalezena evoluční příbuznost s rekombinázami u několika dalších druhů organismů. Příbuzná je například invertáza u bakteriofága TP901-1 bakterie *L. lactis*, místně-specifická rekombináza *spoIVCA* bakterie *B. subtilis* a nebo transponáza, kterou kóduje konjugativní transpozon Tn4451 nalezený u *C. perfringens* (Ito et al., 2001).

4.1.3. J oblasti

Zbývající sekvence SCC*mec* jsou variabilní části nazývané J oblasti, které tvoří pro expresi rezistence k meticilinu postradatelnou složku elementu. Můžeme rozlišit celkem tři J oblasti (J1-J3). J3 je oblast mezi levým koncem SCC*mec* a *mec* komplexem, J2 je oblast mezi komplexem *mec* a *ccr* a J1 je oblast mezi *ccr* komplexem a pravým koncem SCC*mec*. Velkou část J oblastí tvoří otevřené čtecí rámce o neznámé funkci, důležité ale je, že jsou zde integrované mobilní genetické elementy nesoucí mimo jiné geny pro rezistenci vůči dalším antibiotikům a těžkým kovům. Podle variability v těchto oblastech se SCC*mec* dělí do podtypů.

4.2. Klasifikace SCC*mec*

Podle různých kombinací typů *mec* a *ccr* komplexů bylo nalezeno zatím celkem jedenáct (I-XI) typů SCC*mec* (typy I-VIII jsou znázorněny na obrázku č. 2, typy IX a X na obrázku č.3 a typ XI na obrázku č.4). Jednotlivé typy kazet SCC*mec* se klasifikují na základě objevů u MRSA,

většina z nich byla nalezena i u MR-CoNS. První tři typy I-III byly nalezeny v roce 2001 (Ito et al., 2001), zatím poslední typ XI byl nalezen v roce 2011 (Shore et al., 2011). Do budoucna se předpokládá objev ještě další typů tohoto elementu, možný je také další vznik nových typů SCC*mec*, které v současné době neexistují, hlavně díky velkému množství MGE obsažených v SCC*mec* a selekčnímu tlaku antibiotik.

Pokud se u nějakého typu liší stavba zbývajících sekvencí elementu, odlišuje se několik další podtypů SCC*mec*. Variabilita J1 oblasti se značí malými písmenky, například IVA. Přítomnost nebo nepřítomnost dalších konkrétních mobilních genetických elementů je označována velkými písmenky, například IIA. Variabilita ve všech J oblastech J1, J2 a J3 je znázorněna arabskými čísly, například II.1.2.1 (IWG-SCC, 2009).

V následujících podkapitolách popíšu složení jednotlivých typů kazet SCC*mec*.

4.2.1. SCC*mec* typu I

Typ I obsahuje *mec* komplex třídy B a *ccr* komplex typu 1. V tomto typu nejsou zahrnuty žádné geny odpovědné za rezistenci k dalším antibiotikům (Ito et al., 2001).

4.2.2. SCC*mec* typu II

Typ II obsahuje *mec* komplex třídy A a *ccr* komplex typu 2. Byly zde nalezeny dva integrované MGE, plazmid pUB110 s geny pro rezistenci k bleomycinu (*ble*) a pro rezistenci k aminoglykosidům tobramycinu/kanamycinu (*ant4'*) v J3 oblasti a transpozon Tn554 s geny pro rezistenci k erytromycinu a spektinomycinu (*erm/spc*) v J2 oblasti. Oba MGE jsou ohraničeny párem IS431 (Ito et al., 1999).

4.2.3. SCC*mec* typu III

Typ III obsahuje *mec* komplex třídy A a *ccr* komplex typu 3 a byl považován za nejdelší elementy (Ito et al., 2001). Později po objevení tohoto typu bylo zjištěno, že se ve skutečnosti skládá ze dvou SCC a to konkrétně z SCC*mec* a SCC*Hg* (Chongtrakool et al., 2006).

V obou SCC jsou integrované další MGE, které nesou geny podmiňující rezistence vůči jiným antibiotikům než je met icilin. SCC*mec* obsahuje v J3 oblasti plazmid pT181 ohraničený párem IS431, jež kóduje rezistenci k tetracyklinu (*tetK*). V J2 oblasti se nachází

(pseudo)transpozon ψ Tn554, který nese dva geny pro rezistenci ke kadmiu (*cadB/cadC*). *SCCHg* nese gen pro rekombinázu *ccrC*, transpozon Tn554 obklopený párem IS431 s geny pro rezistenci k erytromycinu a spektinomycinu (*erm/spc*) a dále pak samostatný gen pro rezistenci ke rtuti (*mer*).

4.2.4. *SCCmec* typu IV

Typ IV obsahuje *mec* komplex třídy B a *ccr* komplex typu 2. V tomto typu nejsou zahrnuty geny pro další rezistence (Ma et al., 2002). Existují ale tři výjimky. Podtyp IVc obsahuje v J3 oblasti transpozon Tn4001, který nese operon *aacA-aphD* zajišťující rezistenci k aminoglykosidům, transpozon je ohraničen párem IS256 (Gillespie et al., 1987; Ma et al., 2006). Podtyp IVA obsahuje integrovaný plazmid pUB110. Ten nese geny pro rezistenci k různým aminoglykosidům, gen *ant4'* se vyskytuje u všech kmenů s tímto podtypem *SCCmec*, geny *aac6'/aph2'* se vyskytují jen u některých kmenů (Park et al., 2009). Další zvláštností je složení podtypu IV variant (2B&5). Kromě toho, že gen *mecR1* je přerušen transpozonem Tn4001, který obsahuje gen pro rezistenci k aminoglykosidům, má ještě navíc v J3 oblasti třetí rekombinázu *ccrC* (Heusser et al., 2007).

4.2.5. *SCCmec* typu V

Typ V obsahuje *mec* komplex třídy C2 a *ccr* komplex typu 5. V J1 oblasti se nacházejí geny *hdsR*, *hdsS* a *hdsM* kódující částečný restrikně-modifikační systém typu I, který může přispívat ke stabilizaci elementu (Ito et al., 2004). Nejsou zde vloženy žádné MGE nesoucí geny pro další antibiotika. Výjimkou je podtyp Vc, který má v J1 oblasti integrovaný plazmid pT181 s genem pro rezistenci k tetracyklinu (*tetK*), plazmid je ohraničen párem IS431 (Li et al., 2011).

4.2.6. *SCCmec* typu VI

Typ VI obsahuje *mec* komplex třídy B a *ccr* komplex typu 4. Tento typ nezahrnuje žádné geny odpovědné za rezistenci k dalším antibiotikům (Oliveira et al., 2006).

4.2.7. SCCmec typu VII

Typ VII obsahuje *mec* komplex třídy C1 a *ccr* komplex typu 5. V tomto typu nejsou vloženy žádné geny odpovědné za rezistenci k dalším antibiotikům (Berglund et al., 2008).

4.2.8. SCCmec typu VIII

Typ VIII obsahuje *mec* komplex třídy A a *ccr* komplex typu 4. V J2 oblasti je začleněn transpozon Tn554, který nese geny pro rezistenci k erytromycinu (*ermA*) a streptomycinu/spektinomycinu (*aad9*) (Zhang et al., 2009).

4.2.9. SCCmec typu IX

Typ IX obsahuje *mec* komplex třídy C2 a *ccr* komplex typu 1. V J1 oblasti se nachází několik genů pro rezistenci k různým kovům. V tomto typu SCCmec nebyly nalezeny geny pro rezistenci k dalším antibiotikům (Li et al., 2011).

4.2.10. SCCmec typu X

Typ X obsahuje *mec* komplex třídy C1 a *ccr* komplex typu 7. V J1 a J3 oblasti se nachází několik genů pro rezistenci k různým kovům. V tomto typu SCCmec nebyly nalezeny geny pro rezistenci k dalším antibiotikům (Li et al., 2011).

4.2.11. SCCmec typu XI

Typ XI obsahuje *mec* komplex třídy E a *ccr* komplex typu 8. V rámci *mec* komplexu je začleněn proti směru transkripce od *mecA* gen *blaZ* kódující β -laktamázu. J1 obsahuje operon genů zajišťující rezistenci vůči arzenu (Shore et al., 2011). Přítomnost *blaZ* v rámci *mec* komplexu je u SCCmec zvláštností, tato kombinace byla objevena jen u bakterie *M. caseolyticus*, který má v genomu začleněný transpozon s *mec* komplexem se stejnou organizací jako SCCmec typu XI (Tsubakishita et al., 2010a). Spekuluje se tedy, že MRSA získal tuto strukturu právě od *M. caseolyticus*. Přítomnost *mec* komplexu u *M. caseolyticus* je velice zvláštní, je to totiž jediný druh bakterie kromě stafylokoků, ve které byl nalezen. Mohlo by tedy jít o novou evoluční linii SCCmec, která má původ právě v této bakterii.

Type I(1B)
(NCTC10442)

Type II(2A)
(N315)

Type III(3A)
(85/2082)

Type IV(2B)
(CA05)

Type IV(2B&5)
(ZH47)

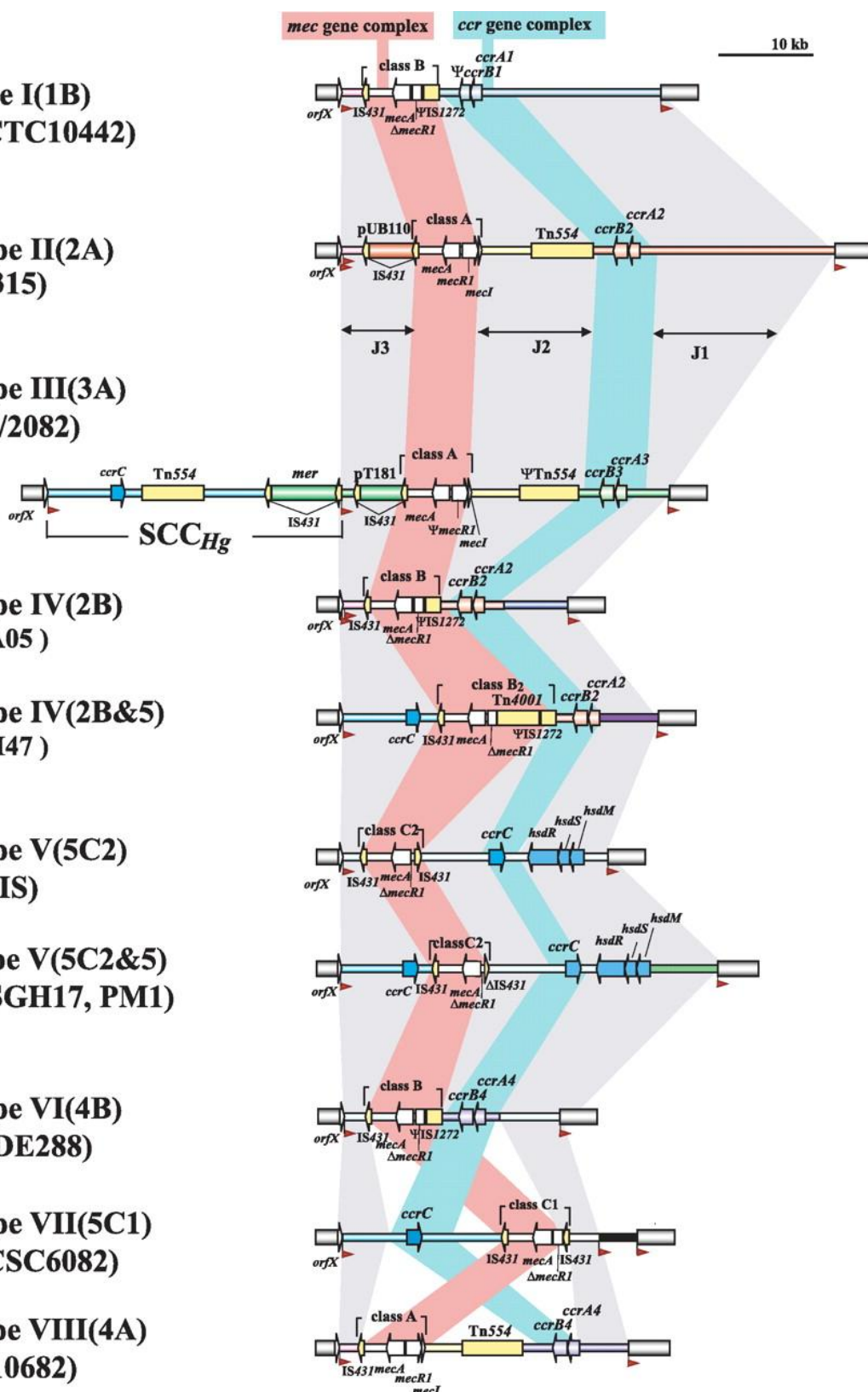
Type V(5C2)
(WIS)

Type V(5C2&5)
(TSGH17, PM1)

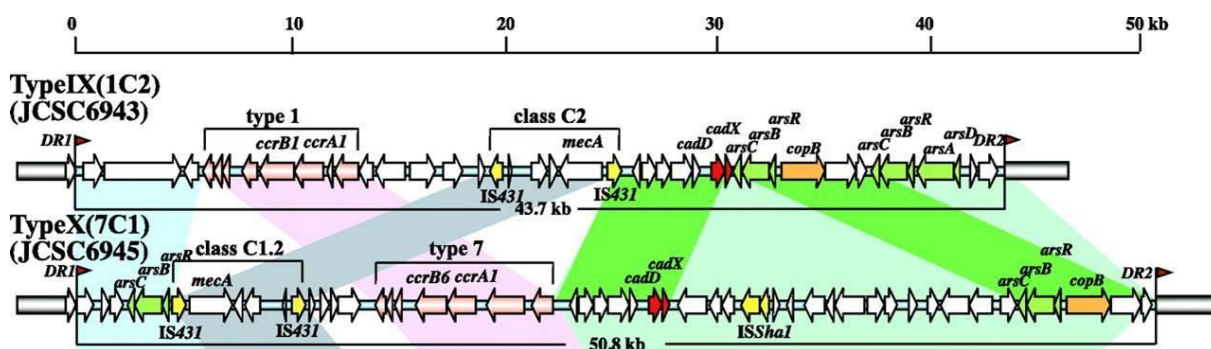
Type VI(4B)
(HDE288)

Type VII(5C1)
(JCSC6082)

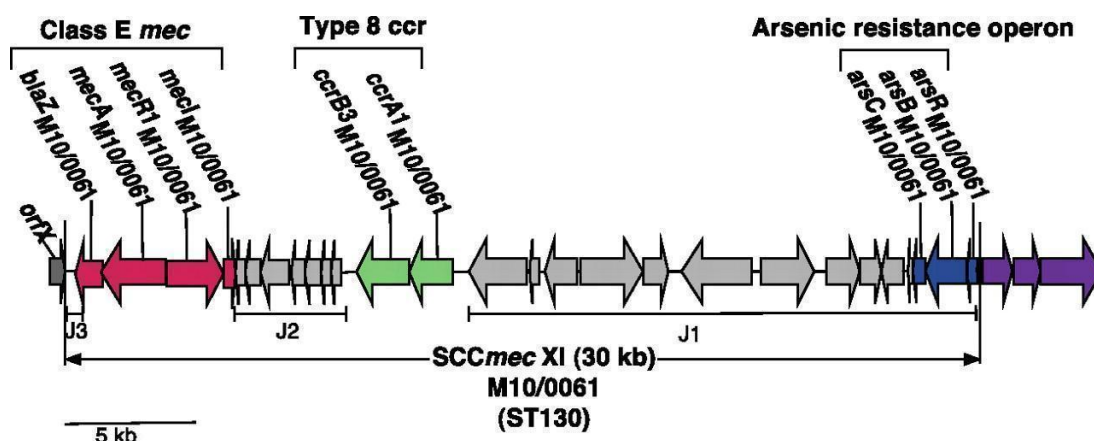
Type VIII(4A)
(C10682)



Obr.2 Struktura základních typů SCCmec elementů objevených do roku 2009. Kód v první závorce popisuje strukturu elementu, kód v druhé závorce je označení kmene MRSA, ze kterého byl daný typ poprvé izolován (převzato z IWG-SCC, 2009). Šedivě jsou označené J oblasti (J3-J1), červeně mec komplex a modře ccr komplexy. Geny a MGE znázorněné v obrázku jsou popsány v textu výše (kapitoly 4.2.1 až 4.2.8).



Obr.3 Struktura SCCmec typu IX a X (převzato z Li et al., 2011). Růžově jsou vyznačeny *ccr* komplexy, tmavě modře *mec* komplexy, zbývající části jsou J oblasti (J3-J1). Žluté šipky vyznačují inzerční sekvence. V J oblastech se nacházejí geny pro rezistence ke kovům, jsou vyznačeny barevnými šipkami (geny pro rezistenci ke kadmii *cadDX* červeně, pro rezistenci k arzeniu *arsRBC* zeleně, pro rezistenci k mědi *copB* oranžově). Bíle jsou označeny otevřené čtecí rámce o neznámé funkci.



Obr.4 Struktura SCCmec typu XI (převzato z Shore et al., 2011). Šedivě jsou označeny J oblasti (J3-J1), červeně *mec* komplex třídy E, zeleně *ccr* komplex typu 8, modře operon s geny pro rezistenci k arzeniu. Fialově je označena přilehlá oblast detekovaná pomocí PCR spolu s SCCmec XI, zahrnuje 3 otevřené čtecí rámce o neznámé funkci.

5. Rozšíření typů SCCmec

Informace o rozšíření jednotlivých typů SCCmec mohou být nápomocny k predikci dalšího vývoje těchto elementů, stejně tak k odhalení původu a molekulární evoluce MRSA. Také z toho důvodu se provádí typizace SCCmec jako jedna ze základních charakteristik kmene při nálezů stafylokoků rezistentních k meticilinu v nemocničních izolátech. Četnost jednotlivých typů SCCmec je celosvětově rozrůzněná. Tato skutečnost mimo jiné podporuje teorii, že šíření meticilin-rezistentních kmenů nemá klonální charakter, což byla dříve obecně

přijímaná hypotéza. I když četnost typů SCCmec kolísá v závislosti na oblasti výskytu daného kmene, lze vypozorovat určité trendy v celosvětovém rozšíření typů SCCmec.

Rozšíření určitého typu SCCmec mezi *S. aureus* závisí kromě geografické lokalizace hlavně také na tom, jestli jde o kmen tzv. nemocničně získaný (hospital-acquired HA-MRSA) nebo získaný ve společnosti (community-acquired CA-MRSA). Nejvíce rozšířené kmeny MRSA nesou SCCmec IV (Strandén et al., 2009; Vindel et al., 2009). Typ IV můžeme nalézt hlavně u CA-MRSA. Mezi HA-MRSA se nejvíce vyskytuje SCCmec I, II a III (Rodrigues et al., 2013; Tsuji et al., 2007), ale počet SCCmec typu IV u tohoto HA-MRSA stále narůstá (Faria et al., 2005; Susan L. Davis et al., 2006).

MR-CoNS jsou velmi různorodou skupinou, stejně tak je u nich rozrůzněný výskyt SCCmec v závislosti na druhu stafylokoka i na místě výskytu. U MR-CoNS byla nalezena většina doposud popsanych typů SCCmec. Studie typů SCCmec u MR-CoNS se provádí hlavně v nemocnicích, počet zástupců jednotlivých druhů stafylokoků není vyrovnaný a proto při analýzách těchto izolátů počet jednotlivých typů SCCmec kolísá. Nejrozšířenější MR-CoNS je *S. epidermidis*, u kterého se nejčastěji vyskytuje SCCmec IV, stejně jako u CA-MRSA. Mezi *S. haemolyticus* je nejvíce zastoupen typ V, u *S. hominis* je to typ VI a VIII (Garza-González et al., 2010; Ibrahim et al., 2009; Jamaluddin et al., 2008; Ruppe et al., 2009; Wisplinghoff et al., 2003; Zong et al., 2011).

Standartní metodou pro určení typu SCCmec je SCCmec typizace. Tato sekvenční analýza je založená na různých metodách PCR. Pro určování SCCmec typu I-VI se používá multiplex PCR (Milheirico et al., 2007; Oliveira and Lencastre, 2002). Pro určení zbývajících typů SCCmec není vyvinutá jednotná komplexní PCR strategie. Jiná stejně často aplikovaná metoda využívá různé PCR analýzy pro charakterizaci *mec* a *ccr* komplexů (metodu vyvinuli Ito et al., 2001). Tyto metody jsou navrženy, standardizovány a zdokonalovány pro určení již známých typů SCCmec u MRSA, používají se ale i pro typizaci SCCmec u MR-CoNS. Z toho důvodu se při komplexních analýzách nemocničních izolátů meticilin-rezistentních stafylokoků nacházejí zvláště u MR-CoNS určité procento netypizovatelných SCCmec, které mohou představovat nové typy SCCmec. Nové typy jsou ale vždy určeny na základě objevů u MRSA. V některých studiích byly u MR-CoNS objeveny nové kombinace *mec* a *ccr* komplexů, nejsou ale zařazeny do platné klasifikace SCCmec, protože zatím nebyly nalezeny u MRSA (Bouchami et al., 2011; Zong et al., 2011)

Zvláště u zvířecích stafylokoků se vyskytuje homolog genu *mecA* samostatně bez přítomnosti *SCCmec* v genomu. Je tomu například u *S. sciuri*, *S. fleuretti*, *S. vitulinus* (Schnellmann et al., 2006; Tsubakishita et al., 2010b; Wu et al., 1998). Předpokládá se, že gen *mecA* obsažený v *SCCmec* má původ v některém z těchto stafylokoků, touto evoluční teorií se budu zabývat v další kapitole. Samostatný gen *mecA* bez *SCCmec* byl objeven i v nemocničních izolátech *S. haemolyticus*, což je lidský oportunní patogen (Zong, 2013).

6. Původ a molekulární evoluce *SCCmec*

I když je původ *SCCmec* předmětem intenzivního zkoumání, je stále neznámý. Byla ale získána data, která určitý směr vývoje *SCCmec* naznačují, avšak stále nepotvrzují. Výchozí problém, kterému se věnuje nejvíce studií, je zjištění původu a porozumění evoluce *SCCmec* u MRSA s ohledem na jeho klinický význam.

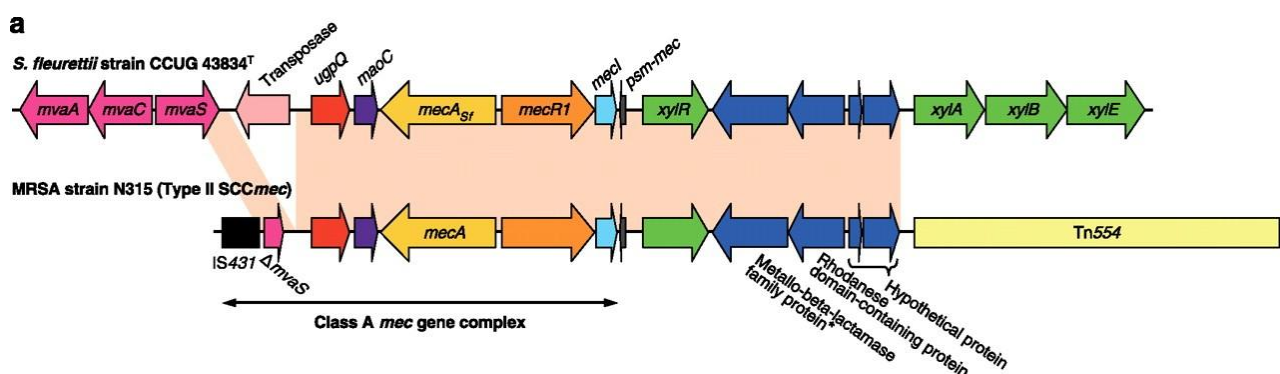
Předpokládá se, že gen odpovědný za rezistenci k meticilinu u stafylokoků pochází z jednoho společného předka. Na rozdíl od genů *ccr*, jejichž nukleotidové sekvence jsou velice rozdílné, homology *mecA* genu jsou totiž téměř identické u všech druhů stafylokoků (Ito et al., 2001). V současné době obecně přijímané teorie o vzniku MRSA je taková, že homolog genu *mecA* byl z jednoho, nejspíš zvířecího, druhu CoNS přenesen do jiného druhu, případně druhů, CoNS, který již obsahoval SCC bez *mec*. Včleněním homologu *mecA* do této struktury vznikla kazeta *SCCmec*. Tento stafylokok by měl figurovat jako rezervoár *SCCmec*. Předpokládá se, že tento rezervoár je parazitem zvířat i lidí, což vytváří podmínky k horizontálnímu přenosu *SCCmec*, resp. *mecA*. *SCCmec* se pak horizontálním přenosem rozšířila i mezi *S. aureus*. Jak již bylo řečeno výše, mechanismus přenosu těchto přenosů je ale stále neznámý.

6.1. Původ *mec* komplexu

Prvotní hypotéza předpokládala, že stafylokok, který by mohl být původní nositel genu *mecA* je *S. sciuri*. Genom většiny kmenů tohoto druhu bakterie obsahuje homolog *mecA* s 80% shodou nukleotidové sekvence s genem *mecA* obsaženým v *SCCmec*, gen *mecA* u tohoto kmene ale není součástí *mec* komplexu a není ohraničen žádnými inzerčními sekvencemi. U některých kmenů je homolog *mecA* spolu s regulačními geny *mecI* a *mecR1*

uspořádán do *mec* komplexu a celý komplex je ohraničen IS431 elementy, má tak strukturu kompozitního transpozonu. Tento homolog *mecA* dosahoval 99% shody nukleotidové sekvence s *mecA* z MRSA (Wu et al., 1998). Tyto kmeny by mohly být původcem *mec* komplexu, který se mohl rozšířit jakožto kompozitní transpozon.

Podle druhé teorie a novějších výzkumů by původní nositel *mecA* mohl být *S. fleuretti*. Sekvenační analýzy blízkých příbuzných druhů *S. sciuri* odhalily, že homolog *mecA* u bakterie *S. fleuretti*, označený jako *mecA_{Sf}*, dosahuje 99% shody s nukleotidovou sekvencí *mecA* u MRSA. Po podrobnější analýze oblasti *mecA* u *S. fleuretti* bylo navíc zjištěno, že její stavba je téměř identická s *mec* komplexem třídy A zahrnutý v SCCmec II, po směru transkripce od *mecA* se ale nevyskytoval IS431 element, který se ale na tomto místě nachází ve všech třídách *mec* komplexů u MRSA. Téměř identické jsou i geny, které ohraničují *mec* komplex. Porovnání obou komplexů je znázorněno na obrázku č.5. Tato vysoká shoda nukleotidové sekvence byla nalezena i u dalších typů SCCmec obsahující *mec* komplex třídy A, tedy SCCmec III a VIII (Tsubakishita et al., 2010b).



Obr.5 Srovnání oblastí *mecA_{Sf}* *S. fleuretti* a *mecA* MRSA (převzato z Tsubakishita et al., 2010b). Oranžové pole znázorňuje geny obsažené v *mec* komplexu a přilehlé geny, které jsou u obou druhů stafylokoků identické.

6.2. Původ SCCmec

Dále se vědci zabývali otázkami, jaký CoNS byl ten, ve kterém se zformovala první SCCmec, která se pak rozšířila i do *S. aureus*, jak vznikly první MRSA kmeny a jak se dále vyvíjely.

Je velmi obtížně zpětně nalézt původního nositele SCCmec a to hlavně kvůli dynamickému genomu stafylokoků. Díky stále probíhajícímu horizontálnímu přenosu

mobilních genetických elementů a blízké příbuznosti druhů stafylokoků je těžké určit, které části genomu jsou pro daný druh stafylokoka původní a které byly získány od jiných druhů stafylokoků.

Existují dvě odlišné teorie o vzniku prvních kmenů MRSA. První říká, že SCCmec se včlenila právě jednou, tedy že existuje pouze jeden původní MRSA kmen a ostatní kmeny mají klonální původ (Deplano et al., 2000), podle jiných teorií vznikly tyto původní MRSA kmeny v různých geografických oblastech nezávisle na sobě a nejen že se stále šíří, ale též vznikají stále nové klony (Enright et al., 2002; Robinson and Enright, 2003). Větší část evolučních biologů zabývajících se tímto tématem se přiklání k druhé variantě.

Rezervoár a druh stafylokoka, ve kterém se zformovala kazeta SCCmec je obtížné určit, tento druh je stále neznámý. Neexistuje jednotný názor na to, který stafylokok by mohl figurovat jako původce SCCmec. Výsledky dosavadních studií přinesly jen nepřímé důkazy, ze kterých vyplývá, že rezervoár a původní nositel SCCmec by mohl být *S. epidermidis*, *S. haemolyticus* (Ruppe et al., 2009) a *S. hominis*. Tyto druhy jsou příbuzné *S. aureus* a způsobují infekce kůže a sliznic u lidí i zvířat. Je ale možné, že SCCmec se poprvé zformovala až v *S. aureus* a z něj se pak rozšířila do ostatních druhů.

Jedním z možných rezervoárů je *S. epidermidis*. *S. epidermidis* a *S. aureus* jsou příbuzné druhy, které obývají v těle hostitele stejná prostředí a dochází mezi nimi velice často k HGT. Na základě výsledků několika projektů se zdá pravděpodobné, že SCCmec typu IV má původ v *S. epidermidis* a z něj se rozšířil do *S. aureus*. SCCmec typu IV je nejrozšířenějším typem mezi MRSA i MRSE. Je to nejmenší popsáný SCCmec, malá velikost tohoto typu SCCmec také mohla usnadnit jeho rozšíření. Byl popsán případ, kdy prokazatelně došlo *in-vivo* k přenosu SCCmec z MRSE (metilicilin-rezistentní *S. epidermidis*) do MSSA (metilicilin-citlivý *S. aureus*). Byly porovnány nukleotidové sekvence dvou nemocničních izolátů MRSA a MRSE. U obou izolátů byl nejvíce zastoupen typ SCCmec IV, jehož nukleotidová sekvence navíc vykazovala téměř 100% homologii (Barbier et al., 2010). Pokud tato data nedokazují, že *S. epidermidis* je původcem SCCmec, s jistotou ale potvrzují horizontální přenos SCCmec mezi různými druhy stafylokoků. Wisplinghoff et al. analyzovali nemocniční izoláty *S. aureus* a *S. epidermidis* ze 70. a 80. let 20. století a zjistili, že v 70. letech se kazeta SCCmec typu IV vyskytovala pouze u MRSE, teprve od 80. let se začala vyskytovat také u MRSA (Wisplinghoff et al., 2003), což by mohl být důkaz, že SCCmec IV nacházející se u MRSA má původ v MRSE.

Jiným prvotním nositelem by mohl být *S. haemolyticus*. Na základě sekvenačních studií izolátů MRSA a MR-*S. haemolyticus* ze švédských nemocnic byla zjištěna 99% shoda nukleotidové sekvence *mec* komplexu třídy C2, což může naznačovat nedávný přenos SCC*mec* typu V, který byl u obou druhů stafylokoků velmi rozšířen (Berglund and Söderquist, 2008).

Předpokládá se, že prvotní forma SCC*mec* typu I pochází z *S. hominis*. U *S. hominis* byla objevená stafylokoková kazeta SCC bez genu *mecA*, obsahovala ale geny pro rekombinázy *ccrAB1*. Tato SCC obsahuje oblasti vysoce homologní s SCC*mec* typu I u MRSA (Katayama et al., 2003). Podle Bouchami et al. by mohl být *S. hominis* rezervoár pro SCC*mec* typu I, VI a VIII. Velmi často se u nich objevují komplexy genů *ccrAB4*, *ccrAB1* a komplex *mecA* třídy A. Kombinace těchto genů tvoří výše uvedené typy SCC*mec*. Geny *ccrB4* a *ccrB1* vykazovaly 92-97% shodu nukleotidové sekvence s *ccrB4* a *ccrB1* geny z MRSA (Bouchami et al., 2011).

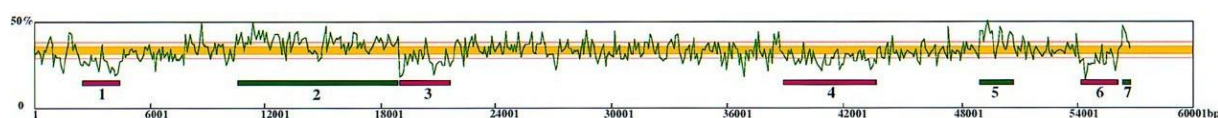
7. Horizontální přenos SCC*mec* a *mecA*

K horizontálnímu přenosu genů dochází u všech bakterií velmi často. Je to důležitý motor evoluce bakterií a odpovídá za dynamiku bakteriálního genomu. Uvedením antibiotik do klinické praxe se zvýšil selekční tlak, který upřednostňuje rezistentní bakterie. Geny pro rezistence na antibiotika jsou vázány na MGE, jejichž evoluce se tímto selekčním tlakem zrychluje. V genomu bakterií můžeme nalézt mnoho genů, které jsou původem z jiného druhu bakterie, a tudíž byly získány horizontálním přenosem. Abychom zjistili, zda je daná sekvence v genomu bakterie původní, můžeme určit obsah GC párů v genomu. Tato hodnota je typická pro každý druh, ale není vždy vypovídající pro určení evolučního původu dané nukleotidové oblasti, blízké příbuzné druhy mají obsah GC párů podobný. Obsah GC párů u *S. aureus* kolísá mezi 32-36%, například pro SCC*mec* II je celkový obsah GC párů 33%, ovšem několik oblastí má obsah GC párů značně rozdílný, což naznačuje odlišný evoluční původ (viz. obrázek 6. Ito et al., 1999). Předpokládáme, že oblasti s takto odlišným poměrem GC párů byly získány horizontálním přenosem z jiných druhů.

Dále existuje velké množství evidovaných případů, kdy prokazatelně došlo k přenosu genů pro meticilinovou rezistenci horizontálním přenosem genů, ať už v rámci druhu nebo i mezidruhově. Byl prokázán *in-vivo* přenos SCC*mec* u pacienta během léčby antibiotiky. V určitém časovém úseku byly vzorky jeho krve a stěry z nosní sliznice testovány na

přítomnost rezistence k antibiotikům u izolovaných bakterií. V prvním odběru byl zjištěn MSSA, z odběru po několika dnech byl již zjištěn MRSA. Dále byl izolován meticilin-rezistentní *S. epidermidis* (MRSE). Ribotypizací a následným osekvenováním celého genomu těchto izolátů MSSA, MRSA a MRSE bylo zjištěno, že MSSA a MRSA jsou identické klony, kromě nepřítomnosti *SCCmec* u MSSA. *SCCmec* nalezená u MRSA byla kromě jedné bodové mutace identická s tou, která byla identifikována u MRSE (Bloemendaal et al., 2010). Lze tedy říci, že v tomto případě téměř jistě došlo k horizontálnímu přenosu *SCCmec* mezi dvěma druhy stafylokoků.

Vědci stále vyvíjí úsilí, aby zjistili, jakým způsobem dochází k šíření genů podmiňujících rezistenci k meticilinu. Neví se, zda k tomu dochází transformací, transdukci, konjugací nebo úplně jiným neznámým způsobem horizontálního přenosu. Mechanismus přenosu MGE obsahující determinanty meticilinové rezistence je stále nejasný.



Obr.6 Mění se obsah GC párů v *SCCmec* II. Žlutá oblast znázorňuje obsah GC párů u *S. aureus*, tato hodnota kolísá mezi 32% – 36%. Červené pruhy vyznačují oblasti s podstatně nižší hodnotou poměru GC párů než je průměr (1 – *attL*, levá oblast včlenění *SCCmec* do chromozomu, 3 – část transponázy, 4 – oblast obsahující regulační geny *mecl* a *mecR1*, 6 – pravý konec *mecA*). Zelené pruhy vyznačují oblasti s podstatně vyšší hodnotou poměru GC párů než je průměr (2 – otevřené čtecí rámce homologní ke *kdp* operonu vyskytující se v *Mycobacterium tuberculosis*, *Clostridium acetobutylicum* a *Escherichia coli*, 5 – oblast obsahující vložený *pUB110* s geny pro rezistenci k bleomycinu a tobramycinu, 7 – *orfX*). Převzato z Ito et al., 1999.

7.1. Transformace

Jeden ze způsobů přenosu genů je transformace, tedy získání cizí DNA přirozeně kompetentní buňkou. Do nedávna neexistovaly žádné zprávy, že by se u stafylokoků přirozeně kompetentní buňky vyskytovaly. Byl ale objeven nový sekundární sigma faktor SigH, jehož aktivací se buňky *S. aureus* staly kompetentní pro transformaci chromozomální nebo plazmidovou DNA. SigH za určitých specifických podmínek asociuje s katalytickým jádrem RNA polymerázy a dochází k transkripci operonu, který je tvořen homology genů *comE* a *comG* odpovědných za navození stavu kompetence (Morikawa et al., 2003). Za laboratorních podmínek ale gen *sigH* nebyl exprimován. První úspěšná transformace

přirozeně kompetentních buněk *S. aureus* byla provedena až několik let poté, kdy se vědcům podařilo najít vhodné podmínky, při kterých je SigH aktivován. Následně dokázali poprvé pomocí transformace přenést celou SCCmec typu II (52 kb) z MRSA kmene N315 do N315ex-h, což je kmen odvozený od N315 s delecí SCCmec, čili je meticilin-citlivý (Morikawa et al., 2012). Ačkoliv do nedávné doby byly stafylokoky považovány za druh, u kterého se přirozená kompetence nevyskytuje, dnes se zdá, že i přirozená transformace je jeden z možných způsobů, jak mohly stafylokoky získat rezistenci k meticilinu. Toto poznání je důležité z toho důvodu, že získání cizí DNA transformací není vázáno na určitý druh. Přirozeně kompetentní buňka může získat v podstatně jakoukoliv DNA, i když další přetrvání cizorodé DNA v recipientní buňce závisí na pravděpodobnosti rekombinace cizorodé DNA s hostitelským chromozomem na základě homologních sekvencí. V případě transformace SCCmec ale není homologie nejspíš nutná, inserce do specifického místa v chromozomu je zprostředkována rekombinázami Ccr, tato skutečnost však nebyla doposud potvrzena.

7.2. Transdukce

Transdukce je přenos genetické informace pomocí temperovaných bakteriofágů, u stafylokoků je to nejefektivnější způsob horizontálního přenosu genů. Již v roce 1970 se podařilo transdukcí přenést rezistenci k meticilinu, aniž by se vědělo, jaký gen je za ni zodpovědný. Tato transdukce byla provedena mezi dvěma kmeny *S. aureus*, donor byl MRSA a recipient MSSA, přičemž vznikly transduktanty s různou citlivostí k meticilinu (Cohen and Sweeney, 1970). K přenosu genů pro rezistenci k meticilinu transdukcí *in vitro* dochází s nízkou frekvencí 10^{-8} , což podle autorů může naznačovat, že *in vivo* tento přenos rezistence k meticilinu musí být velmi vzácný (Stewart and Rosenblum, 1980). Bylo ale prokázáno, že s velkou efektivitou 10^{-5} - 10^{-6} dochází pomocí transdukce k přenosu plazmidů nesoucí gen pro rezistenci k tetracyklinu a gen pro penicilinázu mezi klony USA300 MRSA (Varga et al., 2012).

Nejvíce bakteriofágů vyskytujících se u *S. aureus* patří do čeledi *Siphoviridae*, jde o temperované fágy s velikostí genomu 40-45 kb (Kwan et al., 2005). SCCmec menší než 45 kb mohou být těmito fágy přenášeny. Bakteriofágy čeledě *Siphoviridae* jsou nejrozšířenějšími fágy i u CoNS (Deghorain et al., 2012; Gutiérrez et al., 2010). Doposud ale nebyl objeven bakteriofág, který by byl schopen za laboratorních podmínek přenášet geny pro rezistenci k meticilinu mezi dvě různými druhy stafylokoků (Katayama et al., 2001).

7.3. Konjugace

Přenos genetické informace za pomoci konjugativních plazmidů můžeme nalézt i u stafylokoků. Konjugativní plazmidy obsahují geny pro rezistence na antibiotika, ty se mohou šířit konjugací i mezidruhově, například konjugativní plazmidy ze *S. epidermidis* se mohou přenést do *S. aureus* (McDonnell et al., 1983). Konjugace je podmíněna přítomností genového komplexu *tra*. Ten se může vyskytovat buď na konjugativním plazmidu nebo na konjugativním transpozonu, který se nachází integrovaný do chromosomu. Komplex *tra* ale není v *SCCmec* přítomen (Ito et al., 1999), přenos *SCCmec* nebo *mecA* pomocí konjugace nebyl doposud zjištěn (Lacey, 1972). Novější studie, které by měli za cíl zjištění možnosti přenosu *SCCmec* konjugací, nebyly zatím provedeny.

8. Multirezistentní kmeny stafylokoků spojené s rezistencí k meticilinu

Meticilin rezistentní kmeny stafylokoků jsou často odolné i vůči další antimikrobiálním látkám, jsou tedy multirezistentní. To je dáno již samotnou stavbou *SCCmec*, některé mobilní genetické elementy nesoucí geny pro rezistenci k dalším antibiotikům jsou integrované v J oblastech *SCCmec* a tvoří tak charakteristickou strukturu pro jednotlivé typy a podtypy *SCCmec*. Některé typy *SCCmec* však obsahují jen gen pro rezistenci k meticilinu.

Důležité je, že velká část MGE zahrnutých v *SCCmec* je ohraničena inzerčními sekvencemi, které se v genomu stafylokoků vyskytují i samostatně. Stejně inzerční sekvence proto mohou homologní rekombinací vnést do chromozomu další MGE s geny pro rezistence k antibiotikům. Inzerční sekvence se často párují a vytvářejí kompozitní transpozony, vznikají tak nové MGE (Byrne et al., 1989; Rouch et al., 1987).

V *SCCmec* se nacházejí transpozony a integrované plazmidy. Z transpozonů jsou zastoupeny Tn554 (obsahuje geny *ermA*, *spc*, *aad9*), Tn4001 (*aacA-aphD*) a ψ Tn554 (*cadB*, *cadC*). Integrované plazmidy jsou pT181 (*tet*) a pUB110 (*ble*, *ant4*), (viz. kapitoly 4.2.1 až 4.2.11.)

V evoluci multirezistentních stafylokoků s rezistencí k meticilinu probíhá jednak dynamické přeskupování MGE v rámci *SCCmec*, navíc jsou ale s těmito kmeny spojeny i další MGE, které nesou geny pro různé rezistence bez vazby na *SCCmec*.

K léčbě závažných infekcí způsobených meticilin-rezistentními stafylokoky, zvláště pak těmi multirezistentními, se používá glykopeptidové antibiotiku vankomycin (Walsh, 1999). Některé tyto kmeny se ale v nedávné době staly k vankomycinu rezistentní. Kmeny *S. aureus* rezistentní současně na meticilin a vankomycin se někdy objevují v nemocničních izolátech (Thati et al., 2011). První případ *S. aureus* s velmi vysokou mírou rezistence k vankomycinu byl evidován v roce 2002. Některé kmeny *S. aureus* získaly konjugativní plazmid, který obsahuje transpozon Tn1545 nesoucí gen pro rezistenci k vankomycinu *vanA* od bakterie *Enterococcus faecalis* (Chang et al., 2003). Tento plazmid obsahuje navíc determinanty pro rezistence na další antibiotika, a to na trimethoprim (*dfrA*), β -laktamy (*blaZ*) a aminoglykosidy (*aacA-aphD*) (Weigel et al., 2003).

Mobilní genetické elementy nesou geny, které zvýhodňují hostitele, takové jsou i geny pro různé faktory virulence. Tyto MGE se u stafylokoků kumulují a tím se vytváří kmeny se zvýšenou virulencí, což spolu s výskytem multirezistentních kmenů představuje velký problém.

S CA-MRSA je někdy spojený výskyt toxinu Pantón-Valentinův Leukocidin (PVL), který je významný pro patogenezi stafylokokových infekcí (Isobe et al., 2012; Vandenesch et al., 2003). Geny pro PVL (*lukS-PV* a *lukF-PV*) se nacházejí v genomu několika druhů temperovaných bakteriofágů, například Φ Sa2958, Φ Sa2MW, Φ PVL, Φ 108PVL, Φ SLT a Φ Sa2USA. Ti se začlení do genomu stafylokoka a přežívají ve formě profága (Boakes et al., 2011).

MGE jsou zdrojem genetické variability a flexibility. Získávání dalších MGE, jako jsou transpozony, inzerční sekvence a plazmidy, je pro stafylokoky nezbytné vzhledem k tomu, že se v klinické praxi antibiotika používají stále více a vytváří se tak na bakterie selekční tlak. To vede ke vzniku multirezistentních kmenů, u kterých je léčba poměrně omezená. Vývoj nových antibiotik ale vede ke vzniku dalších rezistencí. V dnešní době je již kladen důraz na omezení používání antibiotik a na vývoj nových prostředků pro boj s bakteriemi. Mezi nově vyvíjené metody léčby patří například fágová terapie (Capparelli et al., 2007) nebo aplikace antimikrobiálních peptidů (Maisetta et al., 2006).

9. Závěr

Infekce způsobené bakteriemi rodu *Staphylococcus* patří mezi nejčastější nozokomiální onemocnění. Způsobují široké spektrum onemocnění, od drobných vyrážek po život ohrožující sepsi. Jako všechny bakteriální infekce i ty stafylokokové se léčí pomocí antibiotik a jako u všech bakterií se i u stafylokoků často objevují rezistence k antibiotikům. Velká část genů pro rezistenci k antibiotikům se nejen u stafylokoků vyskytuje v rámci mobilních genetických elementů, pomocí kterých se rezistence může šířit horizontálním přenosem genů. Mezi stafylokoky je zvláště rozšířená rezistence k meticilinu. Za rezistenci k meticilinu je odpovědný gen *mecA* kódující přídavný penicilin-vázající protein PBP2a. Gen *mecA* se nejčastěji vyskytuje jako součást stafylokokové chromozomové kazety *SCCmec*, jejíž součástí jsou geny pro rekombinázy *Ccr*, které jsou zodpovědné za pohyb tohoto mobilního genetického elementu. I přes to, že jsou součástí *SCCmec* tyto rekombinázy a že přenos *SCCmec* mezi bakteriemi byl zjištěn *in-vivo*, přesný způsob mechanismu šíření *SCCmec* není doposud znám. Stejně tak není známý evoluční původ tohoto mobilního genetického elementu. Další studie mechanismů šíření *SCCmec* jsou důležité zvláště díky úloze *SCCmec* při vzniku multirezistentních kmenů stafylokoků. Některé typy *SCCmec* obsahují geny pro rezistence k dalším antibiotikům a díky selekčnímu tlaku antibiotik a možnosti horizontálního přenosu genů se očekává další šíření a vznik multirezistentních kmenů. To představuje pro léčbu stafylokokových infekcí velký problém, proto je nezbytný další intenzivní výzkum v této oblasti a vývoj jiných způsobů boje s infekcemi než používání antibiotik.

9. Seznam použité literatury

1. Arede, P., Milheirico, C., de Lencastre, H., and Oliveira, D.C. (2012). The Anti-Repressor MecR2 Promotes the Proteolysis of the *mecA* Repressor and Enables Optimal Expression of β -lactam Resistance in MRSA. *PLoS Pathog* 8.
2. Archer, G.L., Thanassi, J.A., Niemeyer, D.M., and Pucci, M.J. (1996). Characterization of IS1272, an insertion sequence-like element from *Staphylococcus haemolyticus*. *Antimicrob Agents Chemother* 40, 924–929.
3. Barberis-Maino, L., Ryffel, C., Kayser, F.H., and Berger-Bachi, B. (1990). Complete nucleotide sequence of IS431mec in *Staphylococcus aureus*. *Nucleic Acids Res* 18, 5548.
4. Barbier, F., Ruppé, E., Hernandez, D., Lebeaux, D., Francois, P., Felix, B., Desprez, A., Maiga, A., Woerther, P.-L., Gaillard, K., et al. (2010). Methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci in the community: high homology of SCCmec IVa between *Staphylococcus epidermidis* and major clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Infect. Dis.* 202, 270–281.
5. Beck, W.D., Berger-Bachi, B., and Kayser, F.H. (1986). Additional DNA in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and molecular cloning of *mec*-specific DNA. *J Bacteriol* 165, 373–378.
6. Bel, A.D., Hoorde, K.V., Wybo, I., Vandoorslaer, K., Echahidi, F., Brandt, E.D., Schumann, P., Ieven, M., Soetens, O., Piérard, D., et al. (2013). *Staphylococcus jettensis* sp. nov., a novel coagulase-negative staphylococcal species isolated from human clinical specimens. *Int J Syst Evol Microbiol*.
7. Berglund, C., and Söderquist, B. (2008). The origin of a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolate at a neonatal ward in Sweden—possible horizontal transfer of a staphylococcal cassette chromosome *mec* between methicillin-resistant *Staphylococcus haemolyticus* and *Staphylococcus aureus*. *Clinical Microbiology and Infection* 14, 1048–1056.
8. Berglund, C., Ito, T., Ikeda, M., Ma, X.X., Soderquist, B., and Hiramatsu, K. (2008). Novel Type of Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* in a Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strain Isolated in Sweden. *Antimicrob Agents Chemother* 52, 3512–3516.
9. Bloemendaal, A.L.A., Brouwer, E.C., and Fluit, A.C. (2010). Methicillin Resistance Transfer from *Staphylococcus epidermidis* to Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* in a Patient during Antibiotic Therapy. *PLoS One* 5.
10. Boakes, E., Kearns, A.M., Ganner, M., Perry, C., Hill, R.L., and Ellington, M.J. (2011). Distinct Bacteriophages Encoding Panton-Valentine Leukocidin (PVL) among International Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Clones Harboring PVL. *J Clin Microbiol* 49, 684–692.
11. Bouchami, O., Ben Hassen, A., de Lencastre, H., and Miragaia, M. (2011). Molecular Epidemiology of Methicillin-Resistant *Staphylococcus hominis* (MRSHo): Low Clonality and Reservoirs of SCCmec Structural Elements. *PLoS ONE* 6, e21940.
12. Boundy, S., Safo, M.K., Wang, L., Musayev, F.N., O’Farrell, H.C., Rife, J.P., and Archer, G.L. (2013). Characterization of the *Staphylococcus aureus* rRNA Methyltransferase Encoded by *orfX*, the Gene Containing the Staphylococcal Chromosome Cassette *mec* (SCCmec) Insertion Site. *J. Biol. Chem.* 288, 132–140.

13. Byrne, M.E., Rouch, D.A., and Skurray, R.A. (1989). Nucleotide sequence analysis of IS256 from the *Staphylococcus aureus* gentamicin-tobramycin-kanamycin-resistance transposon Tn4001. *Gene* 81, 361–367.
14. Capparelli, R., Parlato, M., Borriello, G., Salvatore, P., and Iannelli, D. (2007). Experimental Phage Therapy against *Staphylococcus aureus* in Mice. *Antimicrob Agents Chemother* 51, 2765–2773.
15. Cohen, S., and Sweeney, H.M. (1970). Transduction of Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus* Dependent on an Unusual Specificity of the Recipient Strain. *J Bacteriol* 104, 1158–1167.
16. Costa, S.F., Barone, A.A., Miceli, M.H., van der Heijden, I.M., Soares, R.E., Levin, A.S., and Anaissie, E.J. (2006). Colonization and molecular epidemiology of coagulase-negative *Staphylococcal* bacteremia in cancer patients: A pilot study. *American Journal of Infection Control* 34, 36–40.
17. Deghorain, M., Bobay, L.-M., Smeesters, P.R., Bousbata, S., Vermeersch, M., Perez-Morga, D., Drèze, P.-A., Rocha, E.P.C., Touchon, M., and Van Melderren, L. (2012). Characterization of novel phages isolated in coagulase-negative staphylococci reveals evolutionary relationships with *Staphylococcus aureus* phages. *J. Bacteriol.* 194, 5829–5839.
18. Deplano, A., Witte, W., Van Leeuwen, W.J., Brun, Y., and Struelens, M.J. (2000). Clonal dissemination of epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Belgium and neighboring countries. *Clinical Microbiology and Infection* 6, 239–245.
19. Von Eiff, C., Becker, K., Machka, K., Stammer, H., and Peters, G. (2001). Nasal Carriage as a Source of *Staphylococcus aureus* Bacteremia. *New England Journal of Medicine* 344, 11–16.
20. Enright, M.C., Robinson, D.A., Randle, G., Feil, E.J., Grundmann, H., and Spratt, B.G. (2002). The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 7687–7692.
21. Faria, N.A., Oliveira, D.C., Westh, H., Monnet, D.L., Larsen, A.R., Skov, R., and Lencastre, H. de (2005). Epidemiology of Emerging Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Denmark: a Nationwide Study in a Country with Low Prevalence of MRSA Infection. *J. Clin. Microbiol.* 43, 1836–1842.
22. Fowler, V.G., Jr, Miro, J.M., Hoen, B., Cabell, C.H., Abrutyn, E., Rubinstein, E., Corey, G.R., Spelman, D., Bradley, S.F., Barsic, B., et al. (2005). *Staphylococcus aureus* endocarditis: a consequence of medical progress. *JAMA* 293, 3012–3021.
23. Garnier, F., Tristan, A., Francois, B., Etienne, J., Delage-Corre, M., Martin, C., Liassine, N., Wannet, W., Denis, F., and Ploy, M.-C. (2006). Pneumonia and New Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* Clone. *Emerg Infect Dis* 12, 498–500.
24. Garza-González, E., López, D., Pezina, C., Muruet, W., Bocanegra-García, V., Muñoz, I., Ramírez, C., and Llaca-Díaz, J.M. (2010). Diversity of staphylococcal cassette chromosome mec structures in coagulase-negative staphylococci and relationship to drug resistance. *J. Med. Microbiol.* 59, 323–329.
25. Ghebremedhin, B., Layer, F., Konig, W., and Konig, B. (2008). Genetic Classification and Distinguishing of *Staphylococcus* Species Based on Different Partial gap, 16S rRNA, hsp60, rpoB, sodA, and tuf Gene Sequences. *J Clin Microbiol* 46, 1019–1025.

26. Gillespie, M.T., Lyon, B.R., Messerotti, L.J., and Skurray, R.A. (1987). Chromosome- and plasmid-mediated gentamicin resistance in *Staphylococcus aureus* encoded by Tn4001. *J. Med. Microbiol.* **24**, 139–144.
27. Gutiérrez, D., Martínez, B., Rodríguez, A., and García, P. (2010). Isolation and Characterization of Bacteriophages Infecting *Staphylococcus epidermidis*. *Curr Microbiol* **61**, 601–608.
28. Hanakawa, Y., Schechter, N.M., Lin, C., Garza, L., Li, H., Yamaguchi, T., Fudaba, Y., Nishifuji, K., Sugai, M., Amagai, M., et al. (2002). Molecular mechanisms of blister formation in bullous impetigo and staphylococcal scalded skin syndrome. *J Clin Invest* **110**, 53–60.
29. Hartman, B., and Tomasz, A. (1981). Altered penicillin-binding proteins in methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* **19**, 726–735.
30. Heusser, R., Ender, M., Berger-Bachi, B., and McCallum, N. (2007). Mosaic Staphylococcal Cassette Chromosome mec Containing Two Recombinase Loci and a New mec Complex, B2. *Antimicrob Agents Chemother* **51**, 390–393.
31. Higashide, M., Kuroda, M., Omura, C.T.N., Kumano, M., Ohkawa, S., Ichimura, S., and Ohta, T. (2008). Methicillin-Resistant *Staphylococcus saprophyticus* Isolates Carrying Staphylococcal Cassette Chromosome mec Have Emerged in Urogenital Tract Infections. *Antimicrob Agents Chemother* **52**, 2061–2068.
32. Hiramatsu, K., Asada, K., Suzuki, E., Okonogi, K., and Yokota, T. (1992). Molecular cloning and nucleotide sequence determination of the regulator region of *mecA* gene in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *FEBS Letters* **298**, 133–136.
33. Chambers, H.F., Sachdeva, M.J., and Hackbarth, C.J. (1994). Kinetics of penicillin binding to penicillin-binding proteins of *Staphylococcus aureus*. *Biochem. J.* **301** (Pt 1), 139–144.
34. Chang, S., Sievert, D.M., Hageman, J.C., Boulton, M.L., Tenover, F.C., Downes, F.P., Shah, S., Rudrik, J.T., Pupp, G.R., Brown, W.J., et al. (2003). Infection with Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus* Containing the *vanA* Resistance Gene. *New England Journal of Medicine* **348**, 1342–1347.
35. Chongtrakool, P., Ito, T., Ma, X.X., Kondo, Y., Trakulsomboon, S., Tiensasitorn, C., Jamklang, M., Chavalit, T., Song, J.-H., and Hiramatsu, K. (2006). Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* (SCCmec) Typing of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains Isolated in 11 Asian Countries: a Proposal for a New Nomenclature for SCCmec Elements. *Antimicrob Agents Chemother* **50**, 1001–1012.
36. Ibrahim, S., Salmenlinna, S., Virolainen, A., Kerttula, A.-M., Lyytikäinen, O., Jägerroos, H., Broas, M., and Vuopio-Varkila, J. (2009). Carriage of methicillin-resistant Staphylococci and their SCCmec types in a long-term-care facility. *J. Clin. Microbiol.* **47**, 32–37.
37. Isobe, H., Takano, T., Nishiyama, A., Hung, W.-C., Kuniyuki, S., Shibuya, Y., Reva, I., Yabe, S., Iwao, Y., Higuchi, W., et al. (2012). Evolution and virulence of Panton-Valentine leukocidin-positive ST30 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the past 30 years in Japan. *Biomed. Res.* **33**, 97–109.
38. Ito, T., Katayama, Y., and Hiramatsu, K. (1999). Cloning and Nucleotide Sequence Determination of the Entire *mec* DNA of Pre-Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* N315. *Antimicrob Agents Chemother* **43**, 1449–1458.

39. Ito, T., Katayama, Y., Asada, K., Mori, N., Tsutsumimoto, K., Tiensasitorn, C., and Hiramatsu, K. (2001). Structural Comparison of Three Types of Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* Integrated in the Chromosome in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 45, 1323–1336.
40. Ito, T., Ma, X.X., Takeuchi, F., Okuma, K., Yuzawa, H., and Hiramatsu, K. (2004). Novel Type V Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* Driven by a Novel Cassette Chromosome Recombinase, *ccrC*. *Antimicrob Agents Chemother* 48, 2637–2651.
41. IWG-SCC, I.-S. (2009). Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* (SCC*mec*): Guidelines for Reporting Novel SCC*mec* Elements. *Antimicrob Agents Chemother* 53, 4961–4967.
42. Jamaluddin, T.Z.M.T., Kuwahara-Arai, K., Hisata, K., Terasawa, M., Cui, L., Baba, T., Sotozono, C., Kinoshita, S., Ito, T., and Hiramatsu, K. (2008). Extreme genetic diversity of methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* strains disseminated among healthy Japanese children. *J. Clin. Microbiol.* 46, 3778–3783.
43. Jevons, M.P. (1961). “Celbenin” - resistant *Staphylococci*. *Br Med J* 1, 124–125.
44. Karacal, H., Kymes, S.M., and Apte, R.S. (2007). Retrospective analysis of etiopathogenesis of all cases of endophthalmitis at a large tertiary referral center. *Int Ophthalmol* 27, 251–259.
45. Kashiwada, T., Kikuchi, K., Abe, S., Kato, H., Hayashi, H., Morimoto, T., Kamio, K., Usuki, J., Takeda, S., Tanaka, K., et al. (2012). Staphylococcal enterotoxin B toxic shock syndrome induced by community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA). *Intern. Med.* 51, 3085–3088.
46. Katayama, Y., Ito, T., and Hiramatsu, K. (2000). A New Class of Genetic Element, Staphylococcus Cassette Chromosome *mec*, Encodes Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 44, 1549–1555.
47. Katayama, Y., Ito, T., and Hiramatsu, K. (2001). Genetic Organization of the Chromosome Region Surrounding *mecA* in Clinical Staphylococcal Strains: Role of IS431-Mediated *mecI* Deletion in Expression of Resistance in *mecA*-Carrying, Low-Level Methicillin-Resistant *Staphylococcus haemolyticus*. *Antimicrob Agents Chemother* 45, 1955–1963.
48. Katayama, Y., Takeuchi, F., Ito, T., Ma, X.X., Ui-Mizutani, Y., Kobayashi, I., and Hiramatsu, K. (2003). Identification in methicillin-susceptible *Staphylococcus hominis* of an active primordial mobile genetic element for the staphylococcal cassette chromosome *mec* of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 185, 2711–2722.
49. Kobayashi, N., Alam, M.M., and Urasawa, S. (2001). Genomic rearrangement of the *mec* regulator region mediated by insertion of IS431 in methicillin-resistant staphylococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45, 335–338.
50. Kuwahara-Arai, K., Kondo, N., Hori, S., Tateda-Suzuki, E., and Hiramatsu, K. (1996). Suppression of methicillin resistance in a *mecA*-containing pre-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain is caused by the *mecI*-mediated repression of PBP 2' production. *Antimicrob Agents Chemother* 40, 2680–2685.
51. Kwan, T., Liu, J., DuBow, M., Gros, P., and Pelletier, J. (2005). The complete genomes and proteomes of 27 *Staphylococcus aureus* bacteriophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 5174–5179.

52. Lacey, R.W. (1972). Genetic control in methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus*. *J. Med. Microbiol.* 5, 497–508.
53. Lebeaux, D., Barbier, F., Angebault, C., Benmahdi, L., Ruppe, E., Felix, B., Gaillard, K., Djossou, F., Epelboin, L., Dupont, C., et al. (2012). Evolution of Nasal Carriage of Methicillin-Resistant Coagulase-Negative Staphylococci in a Remote Population. *Antimicrob Agents Chemother* 56, 315–323.
54. Li, S., Skov, R.L., Han, X., Larsen, A.R., Larsen, J., Sørum, M., Wulf, M., Voss, A., Hiramatsu, K., and Ito, T. (2011). Novel Types of Staphylococcal Cassette Chromosome mec Elements Identified in Clonal Complex 398 Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains[▽]. *Antimicrob Agents Chemother* 55, 3046–3050.
55. Luong, T.T., Ouyang, S., Bush, K., and Lee, C.Y. (2002). Type 1 capsule genes of *Staphylococcus aureus* are carried in a staphylococcal cassette chromosome genetic element. *J. Bacteriol.* 184, 3623–3629.
56. Ma, X.X., Ito, T., Tiensasitorn, C., Jamklang, M., Chongtrakool, P., Boyle-Vavra, S., Daum, R.S., and Hiramatsu, K. (2002). Novel Type of Staphylococcal Cassette Chromosome mec Identified in Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains. *Antimicrob Agents Chemother* 46, 1147–1152.
57. Ma, X.X., Ito, T., Chongtrakool, P., and Hiramatsu, K. (2006). Predominance of Clones Carrying Panton-Valentine Leukocidin Genes among Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains Isolated in Japanese Hospitals from 1979 to 1985. *J Clin Microbiol* 44, 4515–4527.
58. Maisetta, G., Batoni, G., Esin, S., Florio, W., Bottai, D., Favilli, F., and Campa, M. (2006). In vitro bactericidal activity of human beta-defensin 3 against multidrug-resistant nosocomial strains. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50, 806–809.
59. McDonnell, R.W., Sweeney, H.M., and Cohen, S. (1983). Conjugational transfer of gentamicin resistance plasmids intra- and interspecifically in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob Agents Chemother* 23, 151–160.
60. Milheirico, C., Oliveira, D.C., and Lencastre, H. de (2007). Update to the Multiplex PCR Strategy for Assignment of mec Element Types in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51, 3374–3377.
61. Miller, L.G., Perdreau-Remington, F., Rieg, G., Mehdi, S., Perlroth, J., Bayer, A.S., Tang, A.W., Phung, T.O., and Spellberg, B. (2005). Necrotizing Fasciitis Caused by Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Los Angeles. *New England Journal of Medicine* 352, 1445–1453.
62. Mombach Pinheiro Machado, A.B., Reiter, K.C., Paiva, R.M., and Barth, A.L. (2007). Distribution of staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) types I, II, III and IV in coagulase-negative staphylococci from patients attending a tertiary hospital in southern Brazil. *J. Med. Microbiol.* 56, 1328–1333.
63. Mongkolrattanothai, K., Boyle, S., Murphy, T.V., and Daum, R.S. (2004). Novel non-mecA-containing staphylococcal chromosomal cassette composite island containing *bbp4* and *tagF* genes in a commensal staphylococcal species: a possible reservoir for antibiotic resistance islands in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 1823–1836.

64. Monsen, T., Olofsson, C., Rönmark, M., and Wiström, J. (2000). Clonal spread of staphylococci among patients with peritonitis associated with continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Kidney Int* 57, 613–618.
65. Morikawa, K., Inose, Y., Okamura, H., Maruyama, A., Hayashi, H., Takeyasu, K., and Ohta, T. (2003). A new staphylococcal sigma factor in the conserved gene cassette: functional significance and implication for the evolutionary processes. *Genes Cells* 8, 699–712.
66. Morikawa, K., Takemura, A.J., Inose, Y., Tsai, M., Nguyen Thi, L.T., Ohta, T., and Msadek, T. (2012). Expression of a Cryptic Secondary Sigma Factor Gene Unveils Natural Competence for DNA Transformation in *Staphylococcus aureus*. *PLoS Pathog* 8.
67. Oliveira, D.C., and Lencastre, H. de (2002). Multiplex PCR Strategy for Rapid Identification of Structural Types and Variants of the *mec* Element in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46, 2155–2161.
68. Oliveira, D.C., Milheirico, C., and de Lencastre, H. (2006). Redefining a Structural Variant of Staphylococcal Cassette Chromosome *mec*, SCCmec Type VI. *Antimicrob Agents Chemother* 50, 3457–3459.
69. Park, C., Shin, H.-H., Kwon, E.-Y., Choi, S.-M., Kim, S.-H., Park, S.H., Choi, J.-H., Yoo, J.-H., Lee, D.-G., and Shin, W.S. (2009). Two variants of staphylococcal cassette chromosome *mec* type IVA in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains in South Korea. *J Med Microbiol* 58, 1314–1321.
70. Patil, R., Baveja, S., Nataraj, G., and Khopkar, U. (2006). Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in community-acquired primary pyoderma. *Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology* 72, 126.
71. Pinho, M.G., Filipe, S.R., de Lencastre, H., and Tomasz, A. (2001). Complementation of the Essential Peptidoglycan Transpeptidase Function of Penicillin-Binding Protein 2 (PBP2) by the Drug Resistance Protein PBP2A in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 183, 6525–6531.
72. Robinson, D.A., and Enright, M.C. (2003). Evolutionary models of the emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 3926–3934.
73. Rodrigues, M.V.P., Fortaleza, C.M.C.B., Riboli, D.F.M., Rocha, R.S., Rocha, C., and Cunha, M. de L.R. de S. da (2013). Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a burn unit from Brazil. *Burns*.
74. Rouch, D.A., Byrne, M.E., Kong, Y.C., and Skurray, R.A. (1987). The *aacA-aphD* Gentamicin and Kanamycin Resistance Determinant of Tn4001 from *Staphylococcus aureus*: Expression and Nucleotide Sequence Analysis. *J Gen Microbiol* 133, 3039–3052.
75. Ruppe, E., Barbier, F., Mesli, Y., Maiga, A., Cojocar, R., Benkhalfat, M., Benchouk, S., Hassaine, H., Maiga, I., Diallo, A., et al. (2009). Diversity of Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* Structures in Methicillin-Resistant *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus haemolyticus* Strains among Outpatients from Four Countries. *Antimicrob Agents Chemother* 53, 442–449.
76. Sauvage, E., Kerff, F., Terrak, M., Ayala, J.A., and Charlier, P. (2008). The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiology Reviews* 32, 234–258.

77. Shore, A.C., Deasy, E.C., Slickers, P., Brennan, G., O'Connell, B., Monecke, S., Ehricht, R., and Coleman, D.C. (2011). Detection of Staphylococcal Cassette Chromosome mec Type XI Carrying Highly Divergent *mecA*, *mecI*, *mecR1*, *blaZ*, and *ccr* Genes in Human Clinical Isolates of Clonal Complex 130 Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* ▽. *Antimicrob Agents Chemother* 55, 3765–3773.
78. Schnellmann, C., Gerber, V., Rossano, A., Jaquier, V., Panchaud, Y., Doherr, M.G., Thomann, A., Straub, R., and Perreten, V. (2006). Presence of New *mecA* and *mph(C)* Variants Conferring Antibiotic Resistance in *Staphylococcus* spp. Isolated from the Skin of Horses before and after Clinic Admission. *J Clin Microbiol* 44, 4444–4454.
79. Stewart, G.C., and Rosenblum, E.D. (1980). Transduction of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: recipient effectiveness and beta-lactamase production. *Antimicrob. Agents Chemother.* 18, 424–432.
80. Strandén, A.M., Frei, R., Adler, H., Flückiger, U., and Widmer, A.F. (2009). Emergence of SCCmec type IV as the most common type of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a university hospital. *Infection* 37, 44–48.
81. Susan L. Davis, P., Michael J. Rybak, P., Muhammad Amjad, P., Glenn W. Kaatz, M., and Peggy S. McKinnon, P. (2006). Characteristics of Patients With Healthcare-Associated Infection Due to SCCmec Type IV Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* •. *Infection Control and Hospital Epidemiology* 27, 1025–1031.
82. Thati, V., Shivannavar, C.T., and Gaddad, S.M. (2011). Vancomycin resistance among methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolates from intensive care units of tertiary care hospitals in Hyderabad. *Indian J Med Res* 134, 704–708.
83. Tsubakishita, S., Kuwahara-Arai, K., Baba, T., and Hiramatsu, K. (2010a). Staphylococcal Cassette Chromosome mec-Like Element in *Macroccoccus caseolyticus*. *Antimicrob Agents Chemother* 54, 1469–1475.
84. Tsubakishita, S., Kuwahara-Arai, K., Sasaki, T., and Hiramatsu, K. (2010b). Origin and molecular evolution of the determinant of methicillin resistance in staphylococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54, 4352–4359.
85. Tsuji, B.T., Rybak, M.J., Cheung, C.M., Amjad, M., and Kaatz, G.W. (2007). Community- and health care-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a comparison of molecular epidemiology and antimicrobial activities of various agents. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 58, 41–47.
86. Vandenesch, F., Naimi, T., Enright, M.C., Lina, G., Nimmo, G.R., Heffernan, H., Liassine, N., Bes, M., Greenland, T., Reverdy, M.-E., et al. (2003). Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Carrying Panton-Valentine Leukocidin Genes: Worldwide Emergence. *Emerg Infect Dis* 9, 978–984.
87. Varga, M., Kuntová, L., Pantůček, R., Mašlaňová, I., Růžicková, V., and Doškař, J. (2012). Efficient transfer of antibiotic resistance plasmids by transduction within methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300 clone. *FEMS Microbiology Letters* 332, 146–152.
88. Vindel, A., Cuevas, O., Cercenado, E., Marcos, C., Bautista, V., Castellares, C., Trincado, P., Boquete, T., Pérez-Vázquez, M., Marín, M., et al. (2009). Methicillin-Resistant *Staphylococcus*

aureus in Spain: Molecular Epidemiology and Utility of Different Typing Methods. *J. Clin. Microbiol.* 47, 1620–1627.

89. Walsh, C. (1999). Deconstructing Vancomycin. *Science* 284, 442–443.
90. Weigel, L.M., Clewell, D.B., Gill, S.R., Clark, N.C., McDougal, L.K., Flannagan, S.E., Kolonay, J.F., Shetty, J., Killgore, G.E., and Tenover, F.C. (2003). Genetic Analysis of a High-Level Vancomycin-Resistant Isolate of *Staphylococcus aureus*. *Science* 302, 1569–1571.
91. Wisplinghoff, H., Rosato, A.E., Enright, M.C., Noto, M., Craig, W., and Archer, G.L. (2003). Related clones containing SCCmec type IV predominate among clinically significant *Staphylococcus epidermidis* isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 3574–3579.
92. Wu, S., de Lencastre, H., and Tomasz, A. (1998). Genetic Organization of the *mecA* Region in Methicillin-Susceptible and Methicillin-Resistant Strains of *Staphylococcus sciuri*. *J. Bacteriol.* 180, 236–242.
93. Zhang, K., McClure, J.-A., Elsayed, S., and Conly, J.M. (2009). Novel Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* Type, Tentatively Designated Type VIII, Harboring Class A *mec* and Type 4 *ccr* Gene Complexes in a Canadian Epidemic Strain of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53, 531–540.
94. Zinkernagel, A.S., Speck, R.F., Ruef, C., Zingg, W., Berger-Bachi, B., and Springer, B. (2005). Rapidly destructive *Staphylococcus epidermidis* endocarditis. *Infection* 33, 148–150.
95. Zong, Z. (2013). Characterization of a complex context containing *mecA* but lacking genes encoding cassette chromosome recombinases in *Staphylococcus haemolyticus*. *BMC Microbiol.* 13, 64.
96. Zong, Z., Peng, C., and Lü, X. (2011). Diversity of SCCmec elements in methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci clinical isolates. *PLoS ONE* 6, e20191.

Internetové zdroje

<http://www.sccmec.org/> - databáze klasifikace SCCmec vytvořena International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome Elements IWG-SCC.