

SVOLUJI K ZAPŮJČENÍ SVÉ DIPLOMOVÉ PRÁCE KE STUDIJNÍM ÚČELŮM A PROSÍM,
ABY BYLA VEDENA PŘESNÁ EVIDENCE VYPŮJČOVATELŮ.
PŘEVZATÉ ÚDAJE JE VYPŮJČOVATEL POVINEN ŘÁDNĚ OCITOVAT.

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
Přírodovědecká fakulta

STUDIJNÍ PROGRAM: BIOLOGIE
STUDIJNÍ OBOR: MIKROBIOLOGIE



Bc. Eva Vařeková

MOLEKULÁRNÍ CHARAKTERIZACE REZISTENCE K MLS_B ANTIBIOTIKŮM
U KMENŮ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* A SCV *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*
OD PACIENTŮ S CYSTICKOU FIBRÓZOU

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF RESISTANCE TO MLS_B ANTIBIOTICS
IN *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* AND SCV *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* STRAINS
OF CYSTIC FIBROSIS PATIENTS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Školitel: doc. MVDr. Oto Melter, PhD.

Praha, 2015

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, 14. 8. 2015

NA TOMTO MÍSTĚ BYCH RÁDA PODĚKOVALA:

ZEJMÉNA DOC. MVDR. OTOVI MELTEROVI, PHD.

A MGR. HONZOVI TKADLECOVI

ZA JEJICH ODBORNÉ VEDENÍ, SDÍLENÍ ZKUŠENOSTÍ, CENNÉ RADY I ŽIVOTNÍ LEKCE,
ALE TAKÉ ZA JEJICH PEVNÉ NERVY A POZITIVNÍ PŘÍSTUP V UPLYNULÉM ROCE,

DÁLE KOLEGŮM Z ÚSTAVU LÉKAŘSKÉ MIKROBIOLOGIE 2. LF UK A FN MOTOL

A Z LABORATOŘE MOLEKULÁRNÍ GENETIKY FN MOTOL

ZA TECHNICKÉ ZÁZEMÍ A NÁPOMOCNOST PŘI ŘEŠENÍ PRAKTICKÉ ČÁSTI TÉTO PRÁCE,

KOLEGŮM Z ÚSTAVU EXPERIMENTÁLNÍ BIOLOGIE PŘF MASARYKOVY UNIVERZITY V BRNĚ

ZA SPOLUPRÁCI NA ŘEŠENÉM PROJEKTU,

V NEPOSLEDNÍ ŘADĚ TAKÉ SVÉ RODINĚ

ZA NEUSTÁLOU PSYCHICKOU PODPORU

A ZDRAVOU STAROSTLIVOST,

A KONEČNĚ SVÉMU MANŽELOVI

ZA TO, ŽE JE.

PRÁCE VZNIKLA ZA FINANČNÍ PODPORY IGA MZ ČR NT12395-5/2011.

ABSTRAKT

Cystická fibróza (CF) je nejčastější autozomálně recesivní onemocnění v kavkazské populaci. Kolonizace dolních cest dýchacích (DCD) bakteriemi vede u pacientů s CF z důvodu narušených procesů přirozené slizniční imunity k chronické infekci a nevratnému poškození plic. V této práci bylo charakterizováno 338 kmenů *S. aureus* izolovaných v letech 2011-2013 z DCD 92 českých pacientů s CF. Metodou spa typizace a makrorestrikční analýzou pomocí PFGE byla zjištěna vysoká klonální heterogenita souboru. Výjimku tvořily klonálně téměř totožné kmeny MRSA (rezistentní k oxacilinu; 5% prevalence). Prevalence rezistence kmenů *S. aureus* k MLS_B antibiotikům dosáhla v našem souboru 69 % a představuje závažný problém vzhledem ke klinickému použití této skupiny léčiv. U poloviny MLS_B rezistentních kmenů nebyla detekována žádná determinanta rezistence (*ermA*, *ermC*, *ermT*, *msrA*). Sekvenováním ribozomálních genů byl v našem souboru prokázán neobvykle vysoký podíl kmenů s mutacemi v zásahových místech MLS_B antibiotik (u 37 % pacientů), což je nová zásadní informace z analýzy kmenů od pacientů s chronickou stafylokokovou infekcí v ČR. Proto byla ověřena mutabilita těchto kmenů. Prozatím se podařilo detekovat u několika kmenů bodové mutace i delece v mutátorových genech *mutS* a *mutL*. Hypermutabilita by mohla vysvětlovat vysoký podíl ribozomálních mutací i výskyt tymidin-auxotrofních SCV kmenů (s 11% prevalencí) a byla by tedy „hnací silou“ adaptace *S. aureus* ke stresujícímu prostředí.

KLÍČOVÁ SLOVA

Staphylococcus aureus, SCV *Staphylococcus aureus*, MLS_B antibiotika, cystická fibróza, hypermutabilita, spa typizace

ABSTRACT

Cystic fibrosis (CF) is the most common autosomal recessive genetic disorder in Caucasians. Lower respiratory tract of CF patients is colonized by specific bacteria, often leading to chronic infection and lung tissue damage. In this thesis we characterized 338 isolates of *S. aureus* from 92 Czech CF patients isolated in 2011-2013. Using *spa* typing and PFGE we detected high clonal heterogeneity of this collection with the exception of MRSA strains (resistant to oxacillin; 5% prevalence) which were clonally related. The prevalence of *S. aureus* MLS_B resistance in our collection was high (69%), which is a serious problem due to common usage of these antimicrobials in clinical practice. A half of the MLS_B resistant strains lacked any known determinant of this resistance (*ermA*, *ermC*, *ermT*, *msrA*). Sequencing of the ribosomal genes revealed a high number of *S. aureus* strains carrying target site mutations resulting in MLS_B resistance (37%). This is new important information about the staphylococcal strains associated with chronic infections in Czech Republic. Focusing on mutability of analysed strains, we also detected several strains with point mutations or deletions in their mutator genes *mutS* a *mutL*. Hypermutability could be responsible for the high rate of ribosomal mutations and for the presence of thymidine-auxotrophic small-colony variant strains (11% prevalence) as well, being a leading force of *S. aureus* adaptation to these stressful environments.

KEY WORDS

Staphylococcus aureus, SCV *Staphylococcus aureus*, MLS_B antibiotics, cystic fibrosis, hypermutability, *spa* typing

OBSAH

1. ÚVOD	9
2. CÍLE	11
3. LITERÁRNÍ PŘEHLED	12
3.1. STAPHYLOCOCCUS AUREUS JAKO POTENCIÁLNÍ PATOGEN	12
3.2. S. AUREUS U PACIENTŮ S CF	13
3.3. REZISTENCE KLINICKÝCH IZOLÁTŮ S. AUREUS	15
3.3.1. MECHANISMY A PREVALENCE REZISTENCE K BETALAKTAMOVÝM ANTIBIOTIKŮM.....	16
3.3.2. MECHANISMY MLS _B REZISTENCE S. AUREUS	18
3.3.3. PREVALENCE MLS _B REZISTENCE U S. AUREUS	22
3.3.4. MECHANISMY A PREVALENCE REZISTENCE K AMINOGLYKOSIDŮM	25
3.4. KLONALITA S. AUREUS	26
3.4.1. TYPIZACE KMENŮ S. AUREUS.....	26
3.4.2. VÝZNAMNÉ KLONÁLNÍ KOMPLEXY S. AUREUS	28
3.5. SMALL COLONY VARIANTS (SCV) S. AUREUS	30
3.6. HYPERMUTABILITA	34
3.6.1. HYPERMUTABILITA JAKO PROSTŘEDEK ADAPTACE	34
3.6.2. PŘÍČINY HYPERMUTABILITY	35
3.6.3. PREVALENCE HYPERMUTABILITY	37
4. MATERIÁL A METODY	40
4.1. MATERIÁL	40
4.1.1. KLINICKÉ IZOLÁTY S. AUREUS Z DÝCHACÍCH CEST PACIENTŮ S CF	40
4.1.2. REFERENČNÍ KMENY	42
4.1.3. KULTIVAČNÍ MÉDIA	42
4.1.4. CHEMIKÁLIE A ROZTOKY	43
4.1.5. ENZYMY	45
4.1.6. PRIMERY PRO PCR.....	45
4.1.7. STANDARDY DNA	47
4.1.8. ANTIBIOTIKA	48
4.1.9. IZOLAČNÍ A DIAGNOSTICKÉ SOUPRAVY	49
4.1.10. SOFTWARE A INTERNETOVÉ DATABÁZE	49
4.2. METODY	50
4.2.1. ODBĚR A MIKROSKOPICKÉ VÝŠETŘENÍ SPUTA.....	50
4.2.2. KULTIVACE A UCHOVÁVÁNÍ IZOLÁTŮ S. AUREUS	50
4.2.3. HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE MALDI-TOF	50
4.2.4. TESTOVÁNÍ AUXOTROFIE	51
4.2.5. TESTOVÁNÍ CITLIVOSTI K ANTIBIOTIKŮM.....	51
4.2.6. IZOLACE DNA	52
4.2.7. LATEXOVÝ AGLUTINAČNÍ TEST PRO PRŮKAZ PBP2A U MRSA	53
4.2.8. POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE (PCR).....	53
4.2.9. HORIZONTÁLNÍ GELOVÁ ELEKTROFORÉZA	54
4.2.10. PULZNÍ GELOVÁ ELEKTROFORÉZA	54
4.2.11. JEDNOLOKUSOVÁ SEKVENAČNÍ TYPIZACE – SPA TYPIZACE	57
4.2.12. TESTOVÁNÍ HYPERMUTABILITY OTISKOVOU METODOU.....	59

5. VÝSLEDKY	60
5.1. VZHLED KOLONIÍ <i>S. AUREUS</i>	60
5.2. IDENTIFIKACE POMOCÍ HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE MALDI-TOF	61
5.3. PRŮKAZ TOXINŮ	61
5.4. TESTOVÁNÍ CITLIVOSTI K ANTIBIOTIKŮM	62
5.5. PRŮKAZ MECHANISMŮ REZISTENCE U REZISTENTNÍCH KMENŮ <i>S. AUREUS</i>	66
5.5.1. PŘÍČINY MLS_B REZISTENCE KMENŮ <i>S. AUREUS</i>	66
5.5.2. DETERMINANTY REZISTENCE KMENŮ MRSA.....	70
5.5.3. DETERMINANTY AMINOGLYKOSIDOVÉ REZISTENCE <i>S. AUREUS</i>	70
5.6. KLONÁLNÍ ANALÝZA SOUBORU IZOLÁTŮ <i>S. AUREUS</i>	71
5.6.1. TYPIZACE NA ZÁKLADĚ MAKRORESTRIKČNÍ ANALÝZY	71
5.6.2. TYPIZACE NA ZÁKLADĚ SEKVENACE GENU <i>SPA</i>	73
5.7. SCV <i>S. AUREUS</i>	78
5.8. TESTOVÁNÍ HYPERMUTABILITY	80
6. DISKUZE	83
7. SOUHRN.....	88
8. SEZNAM LITERATURY	90
9. PŘÍLOHY.....	97

SEZNAM ZKRATEK

ABC	ATP-vazebná kazeta (<i>ATP-binding assette</i>)
ATCC	Americká sbírka typových kultur (<i>American Type Culture Collection</i>)
BHI agar	(<i>brain heart infusion agar</i>)
ca-MRSA	komunitní MRSA (<i>community-associated MRSA</i>)
CC	klonální komplex podle MLST (<i>clonal complex</i>)
CF	cystická fibróza (<i>cystic fibrosis</i>)
CFTR	regulátor transmembránové vodivosti (<i>CF conductance transmembrane regulator</i>)
CFU	kolonii tvořící jednotka (<i>colony forming unit</i>)
CN	gentamicin
co-MRSA	komunitní MRSA v prostředí nemocnice (<i>community-onset MRSA</i>)
DA	klindamycin
DCD	dolní cesty dýchací
E	erytromycin
EARS-Net	Evropská síť národních systémů surveillance rezistence k antibiotikům (<i>European Antimicrobial Resistance Surveillance Network</i>)
ECDC	Evropské centrum pro prevenci a kontrolu nemocí (<i>European Centre for Disease Prevention and Control</i>)
ECFSPR	Registr pacientů Evropské společnosti pro CF (<i>European Cystic Fibrosis Society Patient Registry</i>)
<i>ere</i>	gen pro esterázu erytromycinu (<i>erythromycin esterase gene</i>)
<i>erm</i>	gen pro metylázu ribozomu (<i>erythromycin ribosome methylase</i>)
ESKAPE	<i>Enterococcus faecium, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa a rod Enterobacter</i>
<i>etA</i>	gen pro stafylokokový exfoliatin A (<i>exfoliative toxin A</i>)
EUCAST	Evropská komise pro testování antimikrobiální citlivosti (<i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>)
FOX	cefoxitin
GO systém	8-oxo-deoxyguaninový systém
ha-MRSA	nemocniční MRSA (<i>hospital-associated MRSA</i>)
la-MRSA	MRSA asociované s živočišnou výrobou (<i>livestock-associated MRSA</i>)
<i>lnu</i>	gen pro nukleotidyl-transferázu linkosamidů (<i>lincosamide nucleotidyl-transferase</i>)
LRSA	<i>S. aureus</i> rezistentní k linezolidu (<i>linezolid-resistant S. aureus</i>)
<i>mef</i>	gen pro efluxní pumpu makrolidů (<i>macrolide-efflux gene</i>)
MH agar	Mueller-Hinton agar
MIC	minimální inhibiční koncentrace
MLS _B	makrolidy-linkosamidy-streptogramin B
MLSKO	makrolidy-linkosamidy-streptogramin B-ketolidy-oxazolidinony
MLST	multilokusová sekvenační typizace (<i>multi-locus sequence typing</i>)
MMR	systém pro opravu chybného párování bazí (<i>methyl-directed mismatch repair</i>)
<i>mphC</i>	gen pro makrolidovou 2' fosfotransferázu (<i>macrolide 2' phosphotransferase gene</i>)
MRSA	<i>S. aureus</i> rezistentní k oxacilinu, resp. meticilinu (<i>methicilin-resistant S. aureus</i>)
MS _B	makrolidy-streptograminy B (<i>macrolide-streptogramin B</i>)
<i>msr</i>	gen pro efluxní pumpu (<i>macrolide-streptogramin resistance gene</i>)
MSSA	<i>S. aureus</i> citlivý k meticilinu (<i>methicilin-susceptible S. aureus</i>)
<i>mut</i>	mutátorový gen (<i>mutator gene</i>)
NCTC	Národní sbírka typových kultur (<i>National Collection of Type Cultures</i>)
NCV	normální kolonie (<i>normal colony variant</i>)
OX	oxacilin
PBP	protein vážící penicilin (<i>penicillin-binding protein</i>)
PCR	polymerázová řetězová reakce (<i>polymerase chain reaction</i>)
PFGE	pulzní gelová elektroforéza (<i>pulsed-field gel electrophoresis</i>)
PMN	polymorfonukleární leukocyty
PTC	aktivní centrum peptidyltransferázy (<i>peptidyl transferase center</i>)
PVL	Panton-Valentinův leukocidin (<i>Panton-Valentine leukocidin</i>)
<i>rpl</i>	gen pro protein velké podjednotky ribozomu (<i>ribosomal protein gene of large subunit</i>)

<i>rrl</i>	gen pro rRNA velké podjednotky ribozomu (<i>ribosomal RNA gene of large subunit</i>)
<i>rrn</i>	operon genů pro rRNA (<i>ribosomal RNA operon</i>)
SCC<i>mec</i>	stafylokoková chromozomová kazeta <i>mec</i> (<i>staphylococcal cassette chromosome <i>mec</i></i>)
SCV	„trpasličí“ kolonie (<i>small-colony variant</i>)
<i>seA</i>	gen pro stafylokokový enterotoxin A (<i>staphylococcal enterotoxin A</i>)
<i>spa</i>	gen pro stafylokokový protein A (<i>staphylococcal protein A gene</i>)
spa-CC	spa-klonální komplex (<i>spa-clonal complex</i>)
SSR	krátké repetice (<i>short sequence repeats</i>)
ST	sekvenační typ podle MLST
SXT	trimetoprim-sulfametoxazol (kotrimoxazol)
TSST	toxin syndromu toxického šoku (<i>toxic shock syndrom toxine</i>)
<i>vgb</i>	gen pro lyázu virginiamycinu (<i>virginiamycin B lyase gene</i>)
VISA	<i>S. aureus</i> intermediálně rezistentní k vankomycinu (<i>vankomycin-intermediární S. aureus</i>)
VRSA	<i>S. aureus</i> rezistentní k vankomycinu (<i>vankomycin-resistant S. aureus</i>)

1. ÚVOD

Staphylococcus aureus, zástupce koaguláza-pozitivních stafylokoků, je jedním z nejobávanějších patogenů dnešní doby. Kromě toho, že může produkovat celou řadu faktorů virulence a exogenních toxinů, je závažná zejména jeho schopnost snadno vyvinout či získat rezistenci nebo multirezistenci k různým antibiotikům. Takové klony se snadno šíří a mohou vyvolat epidemie, zvláště v nemocničním prostředí.

Převážná většina kmenů v současné době produkuje penicilinázu a je tedy odolná ke klasickým betalaktamovým antibiotikům. Hojně používaná MLS_B antibiotika (makrolidy, linkosamidy a streptogramin B), kombinovaná při terapii i s jinými léčivy, rovněž již nelze vždy efektivně použít. Tzv. MLS_B rezistence je mezi stafylokoky poměrně rozšířená a mechanismy, které ji vyvolávají, jsou velmi rozmanité. Velkou komplikací je zkříženost MLS_B rezistence k antibiotikům z této skupiny léčiv. Výjimkou není ani rezistence k novějším betalaktamovým antibiotikům typu oxacilinu (MRSA, *Methicillin Resistant S. aureus*), a proto musí být (zvláště v případě MRSA kmenů) používána antibiotika poslední volby jako glykopeptidy vankomycin a teikoplanin, nebo nověji linezolid, jediný zástupce oxazolidinonových antibiotik. Byly však detekovány klinické kmeny rezistentní i k těmto antibiotikům (VRSA, *Vancomycin Resistant S. aureus* a LRSA, *Linezolid Resistant S. aureus*) a přestože je jejich výskyt prozatím spíše sporadický, mohly by do budoucna znamenat velkou hrozbu.

Přestože *S. aureus* se běžně vyskytuje na kůži a sliznicích zvířat i člověka, může za specifických podmínek vyvolat různá onemocnění od banálních až po život ohrožující. Nejčastěji jde o hnisavé infekce nebo intoxikace, ale může dojít také k endokarditidě, osteomyelitidě nebo až nekrotizující pneumonii. Chronické infekce *S. aureus* jsou obtížně léčitelné (např. v případě osteomyelitid vyžadují často chirurgické odstranění ložiska). Léčba těchto infekcí je nejen dlouhodobá, ale také finančně nákladná, zvláště pokud se jedná o rezistentní infikující kmen.

Příkladem onemocnění spojeného s úpornými chronickými infekcemi je cystická fibróza (CF), nejčastější autozomálně recesivní onemocnění v kavkazské populaci, které v České republice postihuje jedno z 2700 narozených dětí. Pacienti s CF mají mutaci v genu pro chloridový kanál CFTR, jehož dysfunkce či úplné chybění vede ke změnám v transportu iontů v různých částech těla. Nejzávažnějším dopadem je nedostatečná hydratace povrchu epitelů, které jsou pak pokryty hustým hlenem komplikujícím zejména fungování dýchací soustavy. Hlen nejenže dýchací cesty pacientů s CF ucpává, ale stává se, v součinnosti s narušením mechanismů nespecifické imunity, také živným prostředím pro oportunní patogeny. Pacienti typicky trpí infekcemi dolních cest dýchacích (DCD) a jejich trvalým zánětem, přičemž postupně dochází k nevratnému poškození plicní

tkáně, její fibróze a ztrátě funkčnosti, kdy poslední záchranou může být transplantace plic. Plicní selhání zůstává nejčastější příčinou úmrtí pacientů s CF, z nichž polovina se dožívá 35 let.

S. aureus je převládajícím patogenem v dětství pacientů s CF. V polovině minulého století byla tato bakterie zodpovědná za úmrtí pacientů ve věku mladším než 10 let, avšak se zavedením protistafylokokové terapie došlo jak k prodloužení věku pacientů s CF, tak také k nástupu dalších patogenů spojovaných s pozdější fází CF a závažnějším poškozením plic, z nichž nejobávanější a zároveň nejčastější je *Pseudomonas aeruginosa*. Přestože pacienti s CF již obvykle neumírají na následky stafylokokové infekce v raném věku, může dojít k exacerbaci (náhlému zhoršení stavu pacienta), kdy je nutné nasadit intervenční terapii antibiotiky, namířenou proti detekovanému bakteriálnímu původci.

Dlouhodobá, opakující se (někdy i celoživotní) antibiotická léčba a vrozené narušení imunitních procesů způsobují selekční tlaky, které ve výsledku vedou k objevování specifických fenoménů ovlivňujících citlivost k některým antibiotikům u kolonizátorů DCD pacientů s CF. Může jít o vznik trpasličích variant (*Small Colony Variants, SCV*) se zpomaleným růstem a utlumenou virulencí, nebo o přechod k hypermutabilitě, kdy může zvýšené generování mutací vést k efektivnímu přizpůsobení se stresujícímu prostředí. Jedná se o pozoruhodné způsoby adaptace při chronické infekci, které bakteriím umožňují uniknout účinku antibiotik a dlouhodobě perzistovat v hostiteli i přes snahy o jejich eradikaci. Pohled na kmeny *S. aureus* izolované od pacientů s CF v průběhu tříletého období je v ČR jedinečnou možností, jak sledovat proměnlivost těchto bakterií během chronické infekce, zejména v otázkách jejich klonality a citlivosti ke klinicky významným antibiotikům.

Tato diplomová práce navazuje na práci bakalářskou, ve které byla provedena rešerše této tematiky – i proto jsou v této práci některá méně relevantní témata z přehledu literatury vynechána (např. cystická fibróza, MLS_B antibiotika). Tato práce navazuje také na pilotní studii Mgr. Jana Tkadlece s několika desítkami kmenů *S. aureus*, kdy nebyla prokázána žádná z determinant MLS_B rezistence u velkého podílu kmenů, a rovněž na menší studii s dvojicemi SCV a NCV kmenů *S. aureus*, ve které byly porovnávány vlastnosti obou těchto morfologických variant.

Tento projekt byl podpořen grantem IGA NT12395-5/2011 a výsledky byly rovněž publikovány v časopise *Microbial Drug Resistance* (Tkadlec *et al.* 2015, viz přílohy).

2. CÍLE

Praktickou náplní této diplomové práce bylo analyzovat retrospektivně vzorky ze sbírky izolátů *S. aureus* od pacientů s CF, kteří jsou v péči Centra CF v Motole, největšího z pěti takových center v České republice. Analýze byly podrobeny izoláty od 92 pacientů odebrané v letech 2011-2013. Na příkladu CF jsme chtěli získat komplexní pohled na *S. aureus* v průběhu dlouhotrvající chronické infekce, zejména v otázkách klonality a citlivosti ke klinicky významným antibiotikům. V ČR se jedná o unikátní projekt s možností sledovat více izolátů od každého pacienta s rozestupem několika let. To je umožněno díky péči o pacienty s CF, kdy jim je odebíráno sputum při pravidelných čtvrtletních kontrolách jejich stavu po celou dobu života.

Naším cílem bylo analýzou velkého souboru izolátů *S. aureus* od českých pacientů s CF:

- stanovit citlivost izolátů k vybraným klinicky významným antibiotikům (zejména MLS_B antibiotikům, ale také aminoglykosidům či oxacilinu pro detekci MRSA)
- u rezistentních izolátů detekovat mechanismy rezistence: nejprve klasické a běžné, poté případně některé vzácněji se vyskytující mechanismy rezistence (méně běžné geny rezistence, mutace) a fenomény s nimi související (SCV morfologie a hypermutabilita)
- analyzovat výskyt a vlastnosti kmenů SCV *S. aureus*
- provést klonální analýzu a zjistit i) zda se některé kmeny stafylokoků vyskytují mezi našimi pacienty častěji, tj. jestli se mezi nimi mohou některé klony či klonální linie epidemicky šířit; ii) jestli se kmen daného pacienta mění v čase; iii) zda došlo při změnách citlivosti k antibiotikům také ke změně kmene, tj. jestli je rezistence vázaná na určitý kmen usnadňující její šíření mezi pacienty.

3. LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1. *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* JAKO POTENCIÁLNÍ PATOGEN

Stafylokoky jsou grampozitivní bakterie vyskytující se v hroznovitých shlucích bez schopnosti pohybu nebo sporulace. Rostou typicky aerobně, ale dokážou růst i fakultativně anaerobně. Místem jejich výskytu je kůže a sliznice člověka i zvířat, kde tvoří součást přirozené mikroflóry.

Staphylococcus aureus, zástupce koaguláza-positivních stafylokoků, bývá řazen mezi tzv. oportunní patogeny, tj. bakterie neškodné pro zdravého jedince s potenciálem vyvolat za specifických podmínek infekci, a to od mírných zánětů kůže až po fatální nekrotizující pneumonie, osteomyelitidy nebo endokarditidy. Přibližně třetina zdravých osob patří k bezpříznakovým nosičům tohoto potenciálního patogena v nosní dutině. U oslabeného organismu (např. po chirurgickém zákroku, úrazu nebo při imunologické nedostatečnosti) však mohou stafylokoky kolonizovat a posléze infikovat jeho tkáně, a to díky řadě rozmanitých faktorů virulence – od strukturálních faktorů přes faktory enzymatické povahy až po toxiny. Pokud jde o strukturu buněk *S. aureus*, jako faktor virulence může sloužit např. pouzdro (chránící před fagocytózou), plazmatická membrána nebo složky buněčné stěny, jako jsou peptidoglykan, teichoová kyselina nebo protein A typický pro stafylokoky. Z enzymů dokáže *S. aureus* produkovat plazmakoagulázu, katalázu, hyaluronidázu, fibrinolysin, lipázy, nukleázy a velmi často také plazmidově kódovanou penicilinázu. Toxiny, které může *S. aureus* kódovat, lze rozdělit do několika skupin. Nejobávanější je toxin syndromu toxického šoku (TSST), který je také superantigenem a vyvolává destrukci endoteliálních buněk. Enterotoxiny, povahou rovněž superantigeny, stimulují proliferaci T buněk a uvolňování cytokinů i jiných zánětlivých mediátorů v těle hostitele (kódovány geny *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *seh*, *sei*, *sej*). Exfoliatiny jsou serinové proteázy štěpící vazby ve svrchních vrstvách epidermis a jejich účinek je tedy dermatolytický; příkladem jsou toxiny EtA, EtB nebo EtD. *S. aureus* může dále kódovat cytotoxiny toxické pro mnoho typů buněk včetně leukocytů, erytrocytů, fibroblastů, makrofágů a krevních destiček – příkladem jsou hemoliziny alfa, beta, gama či delta nebo Panton-Valentinův leukocidin (PVL). Pro stafylokoky je charakteristická zejména beta hemolýza.

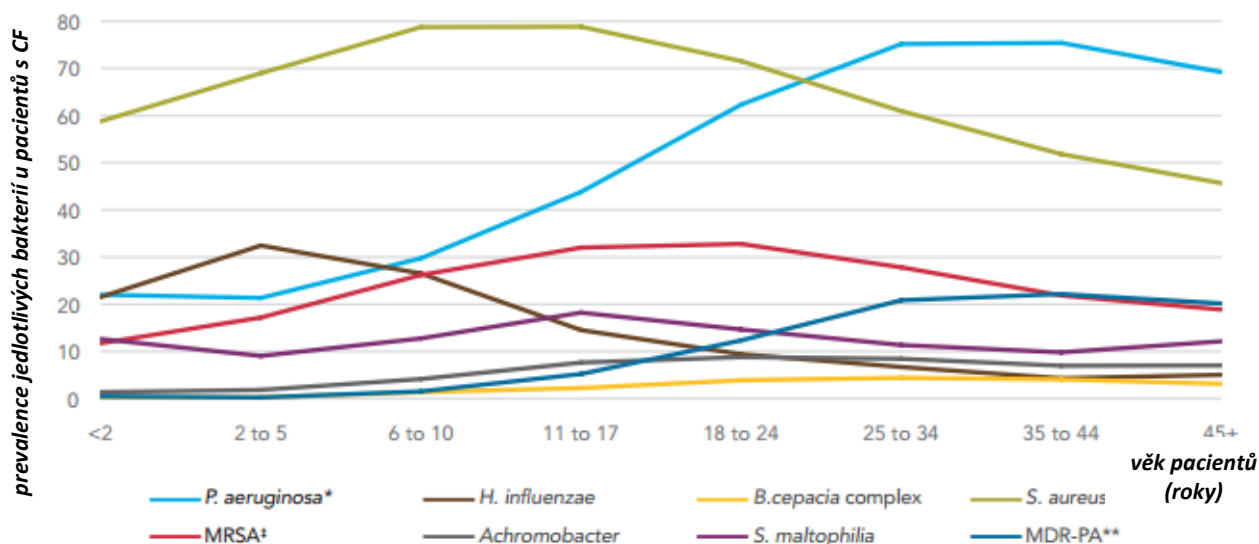
Produkce toxinů však závisí na mnoha proměnných, jakými jsou virulence bakteriálního kmene, fáze růstu nebo fáze infekce – tak např. v časně fázi infekce je výhodné produkovat adheziny usnadňující přichycení k tkáni hostitele, zatímco v pozdějších fázích hrají důležitou roli enzymy umožňující průnik tkáněmi. Důležitou proměnnou je však také samotný hostitel, jeho obranyschopnost a signály z okolního prostředí (Cheung *et al.* 2004).

3.2. S. AUREUS U PACIENTŮ S CF

Pacienti s CF trpí nedostatečnou hydratací povrchu epitelů, které jsou pokryty hustým hlenem komplikujícím zejména fungování dýchací soustavy. Vazký hlen, ucpávající DCD pacientů s CF, zároveň znemožňuje efektivní fungování jejich nespecifické imunitní obrany: znehybňuje řasinky, čistící neustálým pohybem (tzv. mukociliární clearance) slizniční výstelku DCD, dále ucpává vývody žláz produkujících kationtové antimikrobní peptidy a znesnadňuje mobilitu fagocytů, jako jsou polymorfonukleární leukocyty (PMN) nebo makrofágy (Döring a Gulbins 2009).

Dehydratovaná sliznice dýchacích cest se pak stává živným prostředím pro potenciální patogeny. DCD, sterilní u zdravého jedince, jsou u pacientů s CF kolonizovány a infikovány mikrobiálním společenstvem, dynamicky proměnlivým v závislosti na věku pacienta, na závažnosti jeho formy CF (typu mutace v genu pro CFTR kanál) a na jeho celkovém stavu. Z bakterií jsou ve vzorcích sputa nebo bronchoalveolární laváže nacházeny typicky *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, zástupci komplexu *Burkholderia cepacia* nebo *Stenotrophomonas maltophilia* (obr. 1). *Staphylococcus aureus* je jedním z prvních kolonizátorů DCD pacientů s CF, přibližně u poloviny z nich je však tento bakteriální druh detekován rovněž v dospělosti. V pozdějším věku je *S. aureus* často nahrazen či doprovázen *P. aeruginosa*, komplexem *B. cepacia* nebo jinými bakteriemi. Přesto však *S. aureus* zůstává druhým nejčastěji detekovaným bakteriálním původcem z DCD od pacientů s CF (CF Foundation 2012; Viviani *et al.* 2012).

Dolní dýchací cesty jsou díky své členitosti vysoce kompartmentalizované, což může vést k heterogenitě bakteriální populace vyskytující se u jednoho pacienta. Přes oslabené imunitní procesy v DCD se zde *S. aureus* potýká s velmi stresujícím prostředím – s kyslíkovými radikály, dlouhotrvajícím zánětem a lokální anaerobiózou, kdy je kyslík intenzivně spotřebováván některými fagocyty (Kolpen *et al.* 2010). Dochází rovněž ke kompetici o živiny s ostatními patogenními kolonizátory, nejčastěji s pseudomonádou. Akutní infekce často přerůstá v chronickou, s níž se, v součinnosti s intenzivní dlouhotrvající antibiotickou terapií, pojí mnohé fenomény jako SCV nebo hypermutabilita (Prunier *et al.* 2003, Besier *et al.* 2007). Při chronické infekci je pro dlouhodobější přežívání *S. aureus* v hostiteli nutné uniknout imunitní obraně jeho těla, a to zejména utlumením produkce faktorů virulence nebo intracelulární lokalizací. Čím déle perzistuje *S. aureus* v dýchacích cestách pacienta, k tím většímu počtu adaptivních změn u něj dochází: úspěšní perzistoři obvykle ztrácí pouzdro a utlumují hemolýzu (tím je umožněno intracelulární přežívání), tvoří biofilm (chránící před fagocytózou i antibiotiky) nebo se zmenšuje velikost jejich kolonií. Proces adaptace nemá tedy obecný trend, ale sleduje spíše aktuální požadavky nutné k přežití a úspěšnému udržení se v daném místě (Hirschhausen *et al.* 2013).



Obr. 1: Zastoupení bakterií v DCD pacientů s CF podle věku (*S. aureus* světle zeleně). Pozn: V křivce *S. aureus* zahrnuta i detekce MRSA. V křivce *P. aeruginosa* zahrnuta i detekce multirezistentních kmenů (MDR-PA – Multidrug Resistant *P. aeruginosa*). Převzato od CF Foundation 2012.

V důsledku antibiotické léčby se selektují rezistentní a multirezistentní kmeny, z nichž nejobávanější jsou kmeny MRSA, spojované s těžším průběhem infekce (zvláště při chronické infekci) a vyšším rizikem hospitalizace i úmrtí oproti pacientům, kteří se s MRSA setkali pouze akutně nebo nikdy (Ren *et al.* 2007, Dasenbrook *et al.* 2010). Otázkou však vždy zůstává, zda je bakteriální infekce příčinou zhoršení stavu pacienta, nebo až důsledkem závažnosti jeho onemocnění.

Prevalence stafylokokových infekcí u pacientů s CF se v různých zemích liší (tabulka 1), závisí mj. na věku testovaných pacientů nebo počtu analyzovaných izolátů od jednoho pacienta.

Tabulka 1: Prevalence *S. aureus* a trpasličích variant (SCV) *S. aureus* u pacientů s CF v různých zemích světa. V posledním řádku tabulky jsou údaje pro ČR z roku 2010 podle roční zprávy registru pacientů ECFSPR (European CF Society Patient Registry; Zolin *et al.* 2014): údaj však může být zkreslen, protože autoři uvádějí údaje jen pro přibližně 40 % kmenů (208 z celkových 523 pacientů s CF v ČR).

POČET VYŠETŘENÝCH PACIENTŮ S CF	DETEKCE <i>S. AUREUS</i>	DETEKCE SCV <i>S. AUREUS</i> U PACIENTŮ SE STAF. INFEKČÍ	REFERENCE
248	143/248 (57,7 %)	20/143 (14 %)	Yagci <i>et al.</i> 2013 (Turecko)
252	120/252 (47,6 %)	20/120 (16,7 %)	Besier <i>et al.</i> 2007 (Německo)
72	52/72 (72,2 %)	24/52 (46 %)	Kahl <i>et al.</i> 2003a (Německo)
627	275/627 (44%)*	25/242 (10,3 %) **	Vergison <i>et al.</i> 2007 (Belgie)
60	38/60 (63,3 %)	4/38 (10,5 %)	Valenza <i>et al.</i> 2008 (Německo)
63	63	20/63 (31,7 %)	Sadowska <i>et al.</i> 2002 (Polsko)
98	32 (33 %)	8/32 (25 %)	Schneider <i>et al.</i> 2008 (Švýcarsko)
208	105/208 (50,5 %)	-	Zolin <i>et al.</i> 2014 (ČR / ECFSPR)

*uvedena průměrná hodnota; detekováno rozpětí mezi 20 % a 72 % v různých belgických centrech.

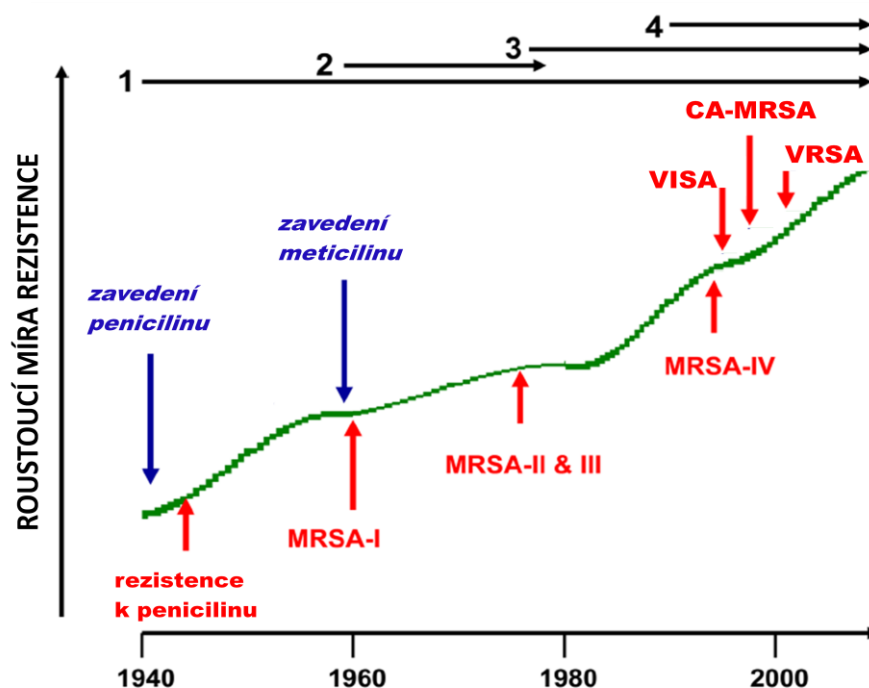
**SCV byly detekovány pouze v několika centrech zapojených do této studie, které se specializují mj. na záchyt těchto atypických variant (výsledek je tedy velmi pravděpodobně podhodnocený)

3.3. REZISTENCE KLINICKÝCH IZOLÁTŮ *S. AUREUS*

S. aureus patří k bakteriím, jejichž rezistence je pro současné zdravotnictví velkou hrozbou. Z toho důvodu je řazen do skupiny tzv. ESKAPE patogenů (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* a rod *Enterobacter*), které „v současnosti způsobují ve Spojených Státech většinu nozokomiálních infekcí a zároveň efektivně unikají (*escape*) účinkům antimikrobních látek“ (Boucher *et al.* 2009, Rice 2008). Situace v Evropě není příliš odlišná. Míra rezistence *S. aureus* navíc graduje, zatímco spektrum použitelných antibiotik proti multirezistentním kmenům se postupně ztenčuje (obr. 2).

Ke klasickému betalaktamovému antibiotiku penicilinu už je většina klinických kmenů *S. aureus* rezistentní (85 % podle Fluit *et al.* 2001; 73 % podle Heijer *et al.* 2013). Antibiotika druhé volby jsou v případě stafylokokových infekcí MLS_B antibiotika (makrolidy, linkosamidy, streptogramin B). Mezi výhody makrolidů patří relativně nízký výskyt nežádoucích účinků a zejména jejich široké spektrum působení, které zahrnuje většinu typických a atypických původců komunitních respiračních infekcí (Urbášková *et al.* 2003). Klasickým makrolidem, dnes už v klinické praxi nepoužívaným, je erytromycin. K makrolidům 2. generace s lepšími farmakokinetickými vlastnostmi jsou řazeny spiramycin, roxitromycin, klaritromycin a azitromycin, z nichž poslední jmenovaný působí mj. protizánětlivě a používá se v nízkých dávkách jako profylaktické léčivo pacientům s CF (Döring *et al.* 2012). Nejnovějšími makrolidovými antibiotiky jsou ketolidy. Mezi linkosamidy patří klindamycin, jehož výhodou je velmi dobrý průnik do tkání. Streptogramin B se klinicky podává pouze v kombinaci se streptograminem A. Hojně používání MLS_B antibiotik, zejména makrolidů a linkosamidů, v klinické praxi vedlo k rozšíření MLS_B rezistence, která je navíc často zkřížená pro všechna antibiotika z této skupiny léčiv.

Penicilinová antibiotika odolná k betalaktamáze, jako jsou meticilin nebo klinicky používaný oxacilin, již však také nemusejí být účinná, a to především na kmeny MRSA. K léčbě infekcí vyvolaných těmito kmeny se používá glykopeptidové antibiotikum vankomycin, nebo nověji také linezolid řazený mezi oxazolidinony (Caulder *et al.* 2013, Wunderink *et al.* 2012), který je považován za univerzálnější a potenciálně bezpečnější lék; případně kotrimoxazol nebo rifampicin. Nicméně se lze ve světě již setkat i s kmeny rezistentními k těmto léčivům poslední volby: VRSA – *Vancomycin Resistant S. aureus*, LRSA – *Linezolid Resistant S. aureus*, (shrnující článek Conly a Johnston 2002; Melo-Cristino *et al.* 2013, Román *et al.* 2013). Zejména kmeny MRSA jsou tedy aktuální hrozbou, protože dostupná antibiotika již nemusejí být účinná.



Obr. 2: Čtyři epidemické vlny rezistence k antibiotikům u *S. aureus* (iniciované vždy jedním či několika úspěšnými klony). Vlna 1 vypukla ve 40. letech, krátce po zavedení penicilinu do klinické praxe, a pokračuje dodnes. Vlna 2 začala brzy po zavedení meticilinu do klinické praxe – objevil se první izolát MRSA, archaický klon SCCmec typu I (MRSA-I). Vlna 3 ze 70. let přinesla nové kmeny MRSA s novým SCCmec typem II a III (MRSA-II a III), které předznamenávaly budoucí celosvětové pandemické šíření MRSA v nemocnicích. Náhlý vzestup užívání vankomycinu k léčbě infekcí vyvolaných MRSA vedl k objevení *S. aureus* intermediálně rezistentního k vankomycinu (VISA). Vlna 4 začala v 90. letech, když se vyskytly komunitní kmeny MRSA (ca-MRSA) citlivé k většině antibiotik kromě betalaktamů, nepříbuzné s kmeny nemocničními (ha-MRSA) a vykazující nový, menší a mobilnější SCCmec typu IV (MRSA-IV) i mnohé faktory virulence včetně PVL. Kmeny rezistentní k vankomycinu (VRSA) se poprvé objevily v roce 2002. Upraveno podle Chambers a DeLeo (2009).

3.3.1. MECHANISMY A PREVALENCE REZISTENCE K BETALAKTAMOVÝM ANTIBIOTIKŮM

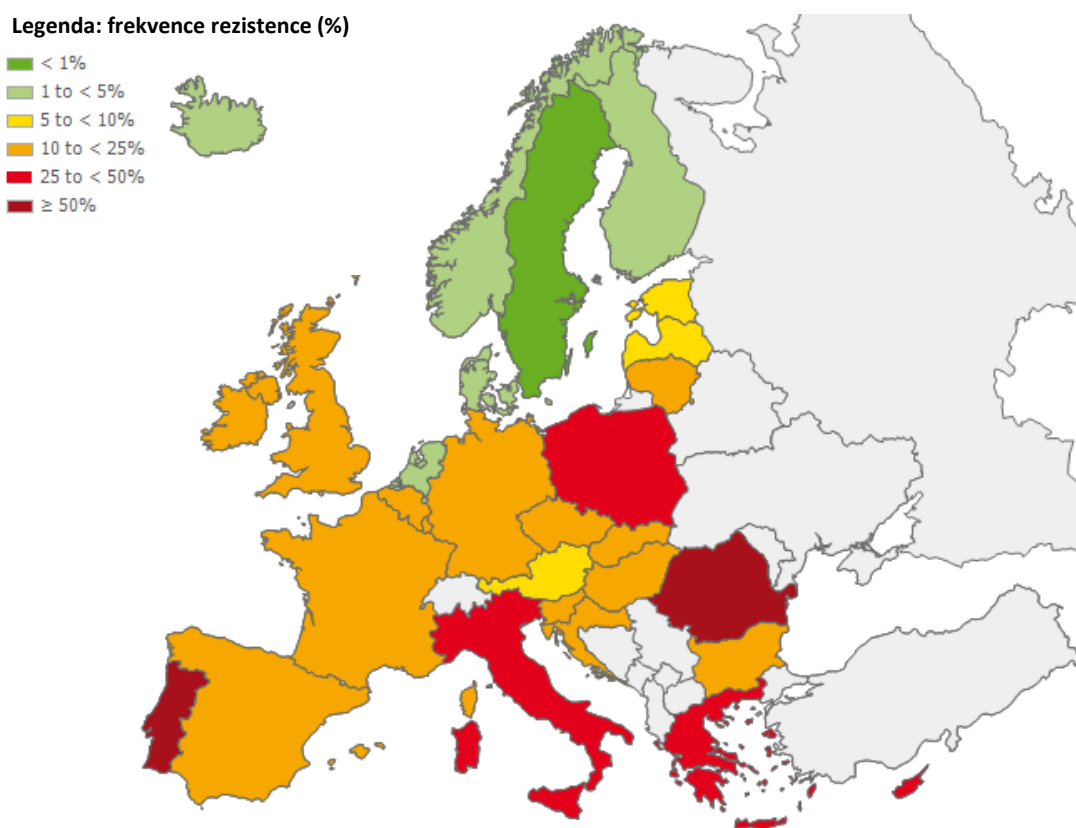
Převážná většina klinických izolátů *S. aureus* v současné době vlastní plazmidově kódovanou penicilinázu, typ betalaktamázy hydrolyzující penicilin a udělující rezistenci k tomuto antibiotiku. Další volbou léčby může být betalaktamové antibiotikum druhé generace typu oxacilinu, které klasická penicilináza nerozštěpí. *S. aureus* však dokáže odolat i tomuto antibiotiku – jde o kmeny *S. aureus* rezistentní k oxacilinu (meticilinu) známé jako MRSA, k jejichž eradikaci nelze uplatnit žádné betalaktamové antibiotikum včetně karbapenemů či kombinací s inhibitory betalaktamáz.

Rezistence kmenů MRSA je založena na změně cílové struktury zasahované antibiotikem. Jejich získaný gen *mecA* kóduje alternativní „proteiny vážící penicilin“, tzv. PBP2 (*Penicillin Binding Protein*), které se, na rozdíl od klasických PBP, mohou podílet na tvorbě buněčné stěny i v přítomnosti betalaktamových antibiotik, neboť k nim mají nižší afinitu. V poslední době se objevují i další alternativní geny rezistence, jako např. *mecC* kódující další alternativní PBP2 (García-Álvarez *et al.* 2011). Tyto kmeny mohou uniknout záchytu kvůli falešně negativní aglutinaci i negativitě

průkazu genu *mecA*, což může mít vážné dopady jak pro pacienty, tak na surveillance kmenů MRSA. Geny *mecA* i *mecC* jsou součástí mobilní chromozomové kazety *SCCmec* (*Staphylococcal Cassette Chromosome mec*) inzerované přímo do chromozomu *S. aureus*. Klasifikace *SCCmec* typu slouží k přesnějšímu rozlišení např. v rámci určitého sekvenčního typu MRSA (*SCCmec* typ I-VII).

V Evropě panují značné rozdíly ve výskytu MRSA mezi jednotlivými zeměmi, a to s pozorovatelným severojižním gradientem (obr. 3). V současné době se prevalence kmenů MRSA mezi invazivními izoláty *S. aureus* v mnoha evropských zemích stabilizovala nebo dokonce snížila. Přesto však MRSA zůstává problémem, neboť prevalence tohoto rezistentního patogena zůstává ve 29 zemích jižní a východní Evropy stále vyšší než 25 % (Evropské centrum pro prevenci a kontrolu nemocí, ECDC, 2014).

V ČR byl v letech 2000-2005 zaznamenán vzestupný trend výskytu MRSA z necelých 4 % v roce 2000 na 12,8 % v roce 2005 (Bergerová *et al.* 2006). Nyní je situace, podobně jako v dalších evropských zemích, stabilizována – prevalence MRSA od roku 2007 do současnosti střídavě kolísá mezi 13-14,5 % (EARS-Net, <http://apps.szu.cz/earsnet/uvod.php>). Rezistence *S. aureus* k vankomycinu či linezolidu v ČR zatím nebyla popsána.



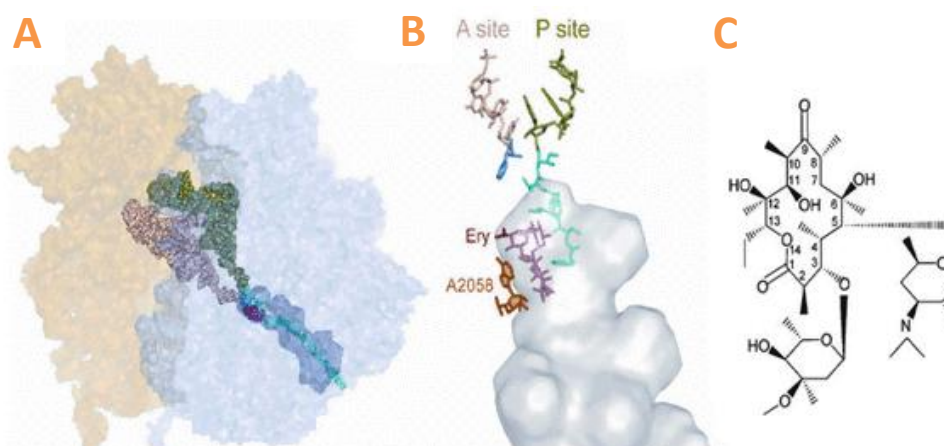
Obr. 3: Procentuální prevalence MRSA mezi invazivními izoláty v Evropě (2012); šedě vyznačeny země, které poskytly méně než 10 izolátů. Převzato z databáze EARS-Net, Evropské centrum pro prevenci a kontrolu nemocí, ECDC.

3.3.2. MECHANISMY MLS_B REZISTENCE *S. AUREUS*

Další alternativou k léčbě stafylokokových infekcí jsou MLS_B antibiotika, mezi které jsou řazeny makrolidy, linkosamidy a streptograminy B. V současnosti se lze setkat s novým označením MLSKO antibiotika (Roberts 2008), kdy se k této skupině léčiv s podobným mechanismem účinku přidávají také ketolidy (deriváty makrolidů) a oxazolidinony (linezolid); v této práci se však věnujeme MLS_B antibiotikům v tradičním pojetí. Ačkoli strukturálně jde o velmi rozmanitá léčiva, spojuje je společné cílové místo účinku v bakteriální buňce – velká ribozomální podjednotka 50S.

Klíčovou oblastí, kam se vážou MLS_B antibiotika, je část velké ribozomální podjednotky zvaná peptidyltransferázové centrum (PTC, *Peptidyle Transferase Center*) a k němu přilehlý ribozomální tunel, kterým prochází každý nově syntetizovaný polypeptid do cytosolu, přičemž tyto oblasti jsou vysoce konzervované. PTC je aktivním místem tvorby peptidové vazby mezi jednotlivými aminokyselinami vznikajícího polypeptidu, a je tvořené smyčkou v doméně V 23S rRNA. Klíčovým nukleotidem pro interakci s MLS_B antibiotiky v této smyčce je adenin v pozicích 2058 a 2059 (A2058 a A2059; číslování podle *E. coli*). Neméně důležitou strukturou je také doména II 23S rRNA, která blíže interaguje se smyčkou domény V, a dále některé ribozomální proteiny, jako např. L4 (*rpID*) a L22 (*rpIV*) regulující stavem své konformace otevřenost ribozomálního tunelu.

MLS_B antibiotika se, pouze s drobnými rozdíly mezi jednotlivými skupinami, vážou právě ke zmiňované PTC oblasti, případně mohou také zablockovat ústí do ribozomálního tunelu (např. makrolaktonovým kruhem makrolidů, který svou hydrofobní částí interaguje se zbytky rRNA tvořící tunel), čímž prakticky znemožní prodlužování syntetizovaného polypeptidu a jeho posun směrem do ribozomálního tunelu (obr. 4). Stericky tak brání v pokračování procesu translace.



Obr. 4: Schematické znázornění klíčových struktur na bakteriálním ribozomu: (a) Ribozom, barevně rozlišený na velkou a malou podjednotku, s vyznačeným tunelem (tmavě šedě), kterým prochází nově syntetizovaný polypeptid (světle modře) do cytosolu. Oblast vázání erytromycinu vyznačena v tunelu tmavě fialově. (b) Detail počátku ribozomálního tunelu s erytromycinem (Ery) navázaným k 23S rRNA v pozici A2058 (vyznačena oranžově), blokujícím průchod syntetizovaného polypeptidu a tím také jeho elongaci. (c) Struktura erytromycinu, makrolidového antibiotika s 14-členným kruhem. Převzato z Subramanian et al. 2012.

Mechanismy MLS_B rezistence *S. aureus* jsou namířené buď proti samotným MLS_B antibiotikům (jejich modifikace nebo aktivní transport ven z buňky), nebo proti cílovému místu jejich účinku (změna struktury klíčových oblastí na ribozomu bakterie, zejména metylace nebo mutace). Molekuly MLS_B antibiotik mohou být jednak modifikovány speciálním enzymem, který pozmění jejich strukturu natolik, že se nevážou ke své cílové struktuře, případně se vážou s mnohem nižší afinitou. Druhou možností je aktivní transport antibiotika ven z bakteriální buňky tzv. efluxními pumpami. Metylací klíčové nukleotidu A2058 nebo A2059, případně substitucí jiné báze namísto adeninu, dochází ke změně struktury a tvaru vazebného místa, které pak není antibiotikem rozeznáno, případně je jeho afinita k ribozomu podstatně snížena. Bakterie s takto pozměněným ribozomem se pak stává vůči příslušnému antibiotiku rezistentní. Charakter rezistence je v mnoha případech inducibilní. Častým jevem je zkřížená rezistence k MLS_B antibiotikům.

METYLACE CÍLOVÉHO MÍSTA

Nejčastějším typem enzymatické modifikace cílového místa MLS_B antibiotik (23S rRNA v pozici A2058 nebo A2059) je u *S. aureus* metylace. Metylázy Erm, kódované geny *erm* (*Erythromycin Ribosome Methylase*), mono- či dimetylují adenin v poloze N6 (Lai a Weisblum 1971). Výsledkem této modifikace je MLS_B fenotyp, kdy se projevuje zkřížená rezistence k makrolidům, linkosamidům i streptograminu B.

Typickými metylázami detekovanými u MLS_B rezistentních kmenů *S. aureus* jsou ErmA, ErmB a ErmC, avšak celkově jich je známo 36 a stále jsou nacházeny dosud nepopsané enzymy tohoto typu. U rezistentních bakterií včetně stafylokoků se v poslední době, přestože zatím sporadicky, objevují i méně běžné metylázy, jako např. ErmF, ErmG, ErmT, ErmQ nebo Erm43 (Roberts 2008; aktualizovaný přehled viz <http://faculty.washington.edu/marilynr/>).

Metylázy jsou často produkovány pouze v přítomnosti induktoru, kterým je samotné antibiotikum, přičemž např. klindamycin je slabý induktor, zatímco erytromycin je silný induktor. Hovoříme pak o tzv. inducibilní rezistenci (iMLS_B), kdy se kmen *S. aureus* může jevit při testování *in vitro* např. jako citlivý ke klindamycinu, avšak při současném použití erytromycinu vzniká rezistence ke všem léčivům z MLS_B skupiny. K odhalení tohoto fenotypu se doporučuje používat diskový difuzní test ve specifickém uspořádání, tzv. D Test (viz kapitola 4.2.5.). Bez induktoru nedochází k expresi genů *erm*; příčinou je patrně posttranskripční atenuace sekundární strukturou mRNA pro budoucí metylázu (Horinouchi a Weisblum 1980). Oproti tomu se vyskytují i kmeny konstitutivně rezistentní k MLS_B antibiotikům (cMLS_B) neustále produkující metylázu.

MUTACE V CÍLOVÉM MÍSTĚ

Vedle modifikace cílového místa účinku MLS_B antibiotik metylací může být jeho struktura pozměněna rovněž mutací. Typicky jde o substituce v konzervovaných oblastech domén V a II 23S rRNA, rovněž však mohou být mutovány geny *rplD* a *rplV* pro ribozomální proteiny L4 a L22, které jsou důležité pro funkční konformaci ribozomálního tunelu (Prunier *et al.* 2002). Zvláště u hypermutátorových kmenů je pravděpodobnost vzniku některé z mutací uvedených v tabulce 2 zvýšená (Prunier *et al.* 2003).

Domény V a II 23S rRNA se podílí na tvorbě vazebného místa MLS_B antibiotik – v doméně V to jsou konkrétně nukleotidy A2058, A2059; v doméně II jde o konzervovaný region ₇₄₈GAAAAGTGAGCGGA₇₆₁, který vytváří vlásenku těsně interagující se smyčkou domény V 23S rRNA (Tait-Kamradt *et al.* 2000). Rezistence vyvolaná mutací spočívá ve většině případů právě v substituci nukleotidů v těchto pozicích, případně v jejich blízkém okolí.

Geny pro 23S rRNA (*rrl*) leží v operonu *rrn*, který je v genomu stafylokoků přítomen typicky v 5-6 kopiích, u kmenů MRSA obvykle pouze v pěti kopiích (Kuroda *et al.* 2001). Záleží tedy mj. na počtu mutovaných kopií genu *rrl* – čím více kopií nese mutaci, tím vyšší míra rezistence je u takového kmene detekována. Pro manifestaci rezistence stačí pouze několik mutovaných kopií tohoto genu (Tait-Kamradt *et al.* 2000).

Tabulka 2: Mutované sekvence rRNA nebo aminokyselin, vyvolávající MLS_B rezistenci. V doméně V 23S rRNA jde zejména o transici nebo transverzi adeninu v pozicích 2058 a 2059 (číslováno podle *E. coli*), V doméně II potom o záměnu nukleotidu v pozicích 748-761. K mutaci nicméně může dojít i v jiných pozicích rRNA. Pokud jde o proteiny L4 a L22, klíčové sekvence jejich aminokyselin jsou uvedené v tabulce; může docházet k delecím, insercím, nebo bodovým mutacím vedoucím k synonymním nebo nesynonymním záměnám aminokyselin.

MUTOVANÁ OBLAST	MUTOVANÁ SEKVENCE nukleotidů nebo aminokyselin	NÁZEV MUTACE	FENOTYP
23S rRNA, doména V	A2058	A2058G, A2058T	MLS _B
23S rRNA, doména V	A2059	A2059G, A2059T	ML
23S rRNA, doména II	₇₄₈ GAAAAGTGAGCGGA ₇₆₁	různé	různý
<i>rplD</i> (L4)	₆₃ KPWKQKTGRAR ₇₄	různé	různý
<i>rplV</i> (L22)	₈₀ ANEGPTMKRFRPRAKGSASPI ₁₀₀	různé	různý

Dále může MLS_B rezistenci vyvolat mutace v konzervovaných oblastech genů pro ribozomální proteiny L4, případně také L22 (Gregory a Dahlberg 1999). Tyto ribozomální proteiny svou strukturou tvoří vnitřní povrch ribozomálního tunelu, a v závislosti na jejich konformaci může dojít ke změně průměru tohoto tunelu. Změna jejich struktury vedoucí k jiné konformaci může

vyvolat až sterické uzavření tohoto tunelu, což ve výsledku znemožňuje právě syntetizovanému polypeptidu, aby se posouval směrem do cytosolu a jeho translace je proto pozastavena (Gabashvili *et al.* 2001).

Protein L22 je kódován genem *rpIV* a je tvořen 117 aminokyselinami. Ke změně jeho konformace zodpovědné za MLS_B rezistenci vedou nejčastěji záměny aminokyselin v C-terminální oblasti tohoto proteinu, konkrétně v pozicích přibližně ⁸⁰ANEGPTMKRFRPRAKGSASPI₁₀₀, např. Gly95Asp, Pro99Gln, Ala93Glu nebo v pozicích 83 a 91 (podle *S. pneumoniae*; Canu *et al.* 2002). Protein L4, kódovaný genem *rplD*, sestává z 207 aminokyselin. K MLS_B rezistenci vedou mutace v jeho konzervovaném regionu ⁶³KPWKQKGTGRAR₇₄ (Tait-Kamradt *et al.* 2000).

Neustále jsou nacházeny dosud nepopsané mutace vyvolávající rezistenci k MLS_B antibiotikům a dalším léčivům cíleným na velkou ribozomální podjednotku, jako je např. linezolid (Locke *et al.* 2009).

EFLUXNÍ PUMPY

Efluxních pump zodpovědných za export MLS_B antibiotik ven z bakteriální buňky bylo popsáno celkem 23 (Roberts 2008). V případě *S. aureus* jde o pumpy z rodiny ABC transportérů (*ATP-Binding Cassette*), dochází tedy k aktivnímu transportu antibiotika, spřaženému s hydrolyzou ATP. U stafylokoků se objevuje např. pumpa MsrA zajišťující rezistenci k makrolidům se čtrnácti- a patnáctičetným kruhem a ke streptograminu B (tzv. MS_B fenotyp). Gen *mrsA* obvykle leží na plazmidu a proto zřejmě tuto pumpu můžeme najít také u mnoha dalších druhů gram pozitivních i gram negativních bakterií. Charakter vyvolané rezistence je opět inducibilní, tj. eflux je aktivován až po vystavení antibiotiku (induktory jsou pouze makrolidy), přičemž může dojít k selekci konstitutivních mutant. Linkosamidy nicméně zůstávají účinné, protože nejsou substrátem pro pumpu MsrA.

ENZYMY MODIFIKUJÍCÍ ANTIBIOTIKA

Dosud bylo u bakterií popsáno celkem 23 enzymů modifikujících MLS_B antibiotika – 13 transferáz (skupiny genů *Inu* a *vat*), 6 fosforyláz (geny *mph*), 2 esterázy makrolidů (*ereA*, *ereB*) a 2 lyázy (*vgbA*, *vgbB*). Enzymy popsané u *S. aureus* jsou uvedeny v tabulce 3.

Tento mechanismus rezistence se od předešlých liší v tom, že je specifitější, tj. daný enzym umí modifikovat pouze strukturně blízce podobné druhy antibiotik. Modifikované antibiotikum není schopné se vázat na své cílové místo v bakteriální buňce.

Tabulka 3: Geny *S. aureus* pro modifikační enzymy MLS_B antibiotik, které mohou být zodpovědné za MLS_B rezistenci: *mphC* (Macrolide 2'Phosphotransferase), *InuA'* (Lincosamide Nuclotidyl-Transferase), *ereA/B* (Erythromycin Esterase), *vgb* (Virginiamycin B Lyase).

GEN	TYP ENZYMU	SUBSTRÁT
<i>mphC</i>	fosfotransferáza	makrolidy
<i>InuA'</i>	nukleotidyltransferáza	linkosamidy
<i>ereA</i>	esteráza	makrolidy
<i>ereB</i>	esteráza	makrolidy
<i>vgb</i>	lyáza (hydroláza)	streptogramin B

3.3.3. PREVALENCE MLS_B REZISTENCE U *S. AUREUS*

PREVALENCE MLS_B REZISTENCE A JEJÍCH DETERMINANT

V roce 1999 byla provedena analýza 1554 izolátů *S. aureus* z dvaceti evropských nemocnic (Schmitz *et al.* 1999). Celkově 22 % kmenů bylo rezistentních k oxacilinu (MRSA), 39 % kmenů neslo rezistenci k erytromycinu. Mezi MSSA byl výskyt MLS_B rezistence detekován přibližně u třetiny kmenů (33,1 %), zatímco u MRSA byla tato rezistence mnohem častější (96,6 %). Dalo by se tedy shrnout, že čím větší podíl MRSA byl v dané evropské zemi detekován, tím vyšší byla také zjištěná míra MLS_B rezistence. Je zajímavé, že u MRSA šlo téměř ve všech případech o konstitutivní rezistenci k erytromycinu, kdežto u MSSA se rezistence projevovala inducibilně u více než poloviny kmenů. U 851 kmenů rezistentních k erytromycinu byly později prokazovány determinanty této rezistence (detailněji viz tabulka 4; Schmitz *et al.* 2000). Nejčastější příčinou rezistence byly geny *ermA* (67 %; 88 % MRSA a 38 % MSSA) a *ermC* (23 %; 5 % MRSA a 47 % MSSA), případně jejich kombinace (3%). Geny *ermB* a *ereB* byly detekovány pouze u 0,6 % kmenů, gen *msrA/B* pro efluxní pumpu neslo 6 % kmenů (pouze MSSA).

Tabulka 4: Determinanty MLS_B rezistence mezi 851 izoláty *S. aureus* z 20 evropských nemocnic. Rozděleno podle inducibilní a konstitutivní rezistence s patřným rozdílem mezi skupinami MRSA a MSSA. Převzato od Schmitz *et al.* 2000.

Genes present	MRSA (n = 493)		MSSA (n = 358)	
	constitutive phenotype (n = 458; 93%)	inducible phenotype (n = 35; 7%)	constitutive phenotype (n = 158; 44%)	inducible phenotype (n = 200; 56%)
<i>ermA</i>	397 (86.7%)	26 (74.2%)	92 (58.2%)	30 (15%)
<i>ermB</i>	2 (0.4%)	0	0	3 (1.5%)
<i>ermC</i>	9 (2.0%)	3 (8.6%)	34 (21.5%)	120 (60%)
<i>ermA</i> and <i>ermB</i>	0	0	0	0
<i>ermA</i> and <i>ermC</i>	9 (2.0%)	3 (8.6%)	11 (7.0%)	3 (1.5%)
<i>ereB</i>	5 (1.1%)	0	0	0
<i>msrA/msrB</i>	0	0	13 (8.2%)	35 (17.5%)
No known gene detectable	36 (7.9%)	3 (8.6%)	8 (5.1%)	9 (4.5%)

V roce 2001 bylo pak v podobné studii analýze podrobena 3051 izolátů *S. aureus* z 25 evropských nemocnic (Fluit *et al.* 2001). Čtvrtina izolátů byla označena jako MRSA. Rezistence k erytromycinu byla zjištěna u 95 % MRSA (většinou konstitutivně) a 32,5 % kmenů MSSA (u třetiny konstitutivně), rezistence ke klindamycinu u 76,7 % MRSA a 6,3 % MSSA a rezistence ke quinupristinu-dalfopristinu pouze u 0,5 % MRSA a 4,7 % MSSA. Výsledky této analýzy se shodují s dalšími podobnými studiemi (např. Lina *et al.* 1999).

V české studii bylo analyzováno celkem 713 kmenů *S. aureus* z 16 českých nemocnic, nejčastěji izolovaných z hnisu a ze sputa, ale také z krve nebo moče (Urbášková *et al.* 2002). Rezistence k erytromycinu byla detekována u 26,8 % kmenů. Prevalence rezistence k oxacilinu (MRSA) byla v tomto souboru 8,4 %. Při rozdělení podle citlivosti k oxacilinu bylo zjištěno, že téměř všechny kmeny MRSA byly současně rezistentní i k erytromycinu (93,3 %) a více než dvě třetiny těchto kmenů byly rezistentní také ke gentamicinu (66,7 %), zatímco rezistence k těmto antibiotikům u kmenů citlivých k oxacilinu byla méně častá (erytromycin 18,2 %, gentamicin 2,3 %).

V jiné studii MLS_B rezistence z roku 2003 bylo analyzováno 100 kmenů MRSA izolovaných z více než dvaceti různých nemocnic v ČR (Melter *et al.* 2003). Téměř všechny tyto kmeny MRSA (98 %) byly rezistentní k erytromycinu, a to díky jednomu nebo více genům *erm*, velká většina byla rezistentní také ke klindamycinu (86 %).

Mimo Evropu byla např. v indické studii mezi celkovými 142 testovanými koaguláza-positivními kmeny stafylokoků detekována 52% prevalence rezistence k erytromycinu a 25% prevalence rezistence ke klindamycinu, přičemž k druhému jmenovanému antibiotiku bylo 16 % kmenů rezistentních inducibilně (Thakar *et al.* 2014).

Dalo by se tedy shrnout, že prevalence MLS_B rezistence dosahuje celosvětově poměrně vysokých hodnot, avšak u kmenů MRSA se vyskytuje mnohem častěji s téměř stoprocentní prevalencí. Přibližně u třetiny MLS_B rezistentních kmenů MSSA mívá tato rezistence inducibilní charakter. Příčinou MLS_B rezistence bývají u *S. aureus* nejčastěji geny *ermA*, *ermC* a *msrA*.

PREVALENCE MUTACÍ VYVOLÁVAJÍCÍCH MLS_B FENOTYP

Prevalence mutací vyvolávajících MLS_B rezistenci je oproti prevalenci genů rezistence obvykle nízká. V již zmiňované rozsáhlé studii MLS_B rezistentních kmenů *S. aureus* z dvaceti evropských nemocnic (Schmitz *et al.* 2000) nebyla nalezena žádná z testovaných determinant rezistence u pouhých 8 % kmenů MRSA (39 ze 493) a u 5 % kmenů MSSA (17 z 358). Ke zvýšenému výskytu mutací dochází především u hypermutabilních kmenů v důsledku stresujícího prostředí, ale pravděpodobně také následkem léčby některými antibiotiky typu azitromycinu.

Mezi kmeny *S. aureus* od pacientů s CF je prevalence mutací vedoucích k MLS_B fenotypu mnohem vyšší. U poloviny z 12 testovaných MLS_B rezistentních kmenů *S. aureus* od pacientů s CF nebyl nalezen žádný běžný gen rezistence (*erm*, *msrA*; Prunier *et al.* 2002). Sekvenací *rrl* genů pro 23S rRNA těchto kmenů byly u všech z nich prokázány mutace v zásahových místech MLS_B antibiotik (A2058G/U nebo A2059G), přičemž byla vždy mutována většina kopií tohoto genu. Jeden kmen nesl navíc mutaci v genu *rplV* pro ribozomální protein L22 (deleci 3 aminokyselin v pozici 101).

V pozdější studii tatáž autorka detekovala mezi izoláty *S. aureus* od pacientů s CF zvýšený výskyt mutací zodpovědných za jejich MLS_B rezistenci (Prunier *et al.* 2003). Analýze bylo podrobena 20 MLS_B rezistentních izolátů od 9 pacientů s chronickou infekcí trvající déle než 18 měsíců. Tyto izoláty opět nekódovaly typické geny rezistence, zato se u nich ve 12 případech vyskytla mutace v 23S rRNA (A2058 nebo A2059) a v 5 případech mutace v konzervovaných regionech genů pro proteiny L4 a L22. U izolátů od téhož pacienta byly pozorovány změny rezistence v čase (tabulka 5): u časných a pozdních izolátů byly v několika případech nalezeny odlišné mutace v pozicích A2058 nebo A2059; u některých pacientů se rezistence projevila až u jejich pozdních izolátů *S. aureus*. Kromě mutací v konzervovaných oblastech bylo nalezeno také mnoho synonymních (*silent*) mutací, což podle autorů naznačuje hypermutabilní povahu testovaných kmenů. Jako příčinu zvýšeného výskytu mutací uvádějí autoři dlouhotrvající (alespoň tříměsíční) léčbu těchto pacientů azitromycinem v subterapeutických dávkách podávanou v jejich centru CF.

Tabulka 5: Determinanty rezistence u 20 izolátů od 9 pacientů s CF. Upraveno podle Prunier *et al.* 2003, červené podtržení značí mutace spojované s MLS_B rezistencí u jiných bakterií než je *S. aureus*.

KMEN	ZÍSKANÝ GEN REZISTENCE	MUTACE (PŘÍPADNĚ POČET MUTACÍ) V DANÉ OBLASTI:			
		23S rRNA DOMÉNA V	23S rRNA DOMÉNA II	rplD (L4)	rplV (L22)
1A	—	<u>A2058T</u>	—	—	—
1B	—	<u>A2059G</u>	—	—	—
1C a 1D	—	<u>A2058G</u>	—	—	—
2B	<i>erm</i>	—	—	—	—
2C	—	<u>A2058G</u>	—	—	—
3A	<i>erm</i>	4	8	6	—
3C	<i>erm</i>	16	—	—	—
3D	<i>erm</i>	—	—	—	—
4A a 4B	<i>msrA</i>	T2089C, C2207T	—	—	—
5B	<i>erm</i>	C2163T	7	14	1
5C, 5D a 5E	—	<u>A2058G</u> , C2207T	—	—	—
6B	—	<u>A2058G</u> + 3 další	—	—	—
6C	—	<u>A2058G</u>	—	—	<u>1</u>
7	—	—	—	<u>2</u>	—
8	—	<u>A2059G</u>	—	—	—
9	—	<u>A2058G</u>	—	—	—

Tatáž autorka detekovala u dvou kmenů mutace v genu pro ribozomální protein L4 vedoucí k makrolidové rezistenci (Prunier *et al.* 2005). U obou kmenů šlo o mutace Gly69Ala a Thr70Pro v konzervovaném regionu ${}_{63}\text{KPWKQKGTGRAR}_{74}$ (detekované dříve u *Str. pneumoniae*), u jednoho z nich navíc v kombinaci s mutací Arg168Ser. Ke klindamycinu zůstaly tyto kmeny plně citlivé a nebyly u nich detekovány geny *erm* ani *mrsA*.

3.3.4. MECHANISMY A PREVALENCE REZISTENCE K AMINOGLYKOSIDŮM

Rezistence k aminoglykosidům je nejčastěji vyvolána modifikací těchto antibiotik příslušnými enzymy (tzv. aminoglykosidové modifikační enzymy), přičemž může jít o acetylaci, fosforylaci nebo adenylaci. Pro stafylokoky jsou typické zvláště determinanty *aadC*, *aphA3* nebo kombinace genů *aacA-aphD* kódující bifunkční enzym AAC(6′)-APH(2″), nesené na plasmidech nebo transpozonech (Vanhoof *et al.* 1994, shrnuto u Shaw *et al.* 1993) a popsané blíže v tabulce 6.

Na konci 90. let byla v Evropě detekována rezistence ke gentamicinu v průměru u 23 % všech testovaných kmenů *S. aureus* (164/699), což byla téměř dvojnásobná hodnota oproti podobné studii z předešlého desetiletí – prevalence v jednotlivých zemích se však lišila od 0 % v Polsku až po 67 % v Itálii (Schmitz *et al.* 1999). Prevalence aminoglykosidové rezistence korelovala velmi dobře s výskytem MRSA, který je častější v zemích jižní Evropy. Při rozdělení podle citlivosti k oxacilinu byla rezistence ke gentamicinu detekována v průměru u 4 % kmenů MSSA (19/505) a 75 % kmenů MRSA (145/194). Obecně k aminoglykosidům byla však rezistence častější, a to 8 % mezi MSSA (38/505) a 98 % mezi MRSA (191/194). Z determinant rezistence k aminoglykosidům byly nejčastěji detekovány geny *aacA-aphD* (19 MSSA a 145 MRSA) nebo *aadC* (16 MSSA a 102 MRSA), méně často potom gen *aphA3* (5 MSSA a 13 MRSA).

Tabulka 6: Nejčastěji detekované geny rezistence zodpovědné za rezistenci ke gentamicinu. Uvedeny jsou také názvy jimi kódovaných enzymů.

GEN REZISTENCE	PRODUKT GENU REZISTENCE	NÁZEV ENZYMU
<i>aadC</i>	ANT(4′ 4″)	aminoglykosid-4′-O-nukletidyltransferáza
<i>aphA3</i>	APH(3′)III	aminoglykosid-3′-O-fosfotransferáza III
<i>aacA-aphD</i>	AAC(6′)-APH(2″)	aminoglykosid-6′-N-acetyltransferáza/2″-O-fosfotransferáza

V současnější studii v Polsku (Hauschild *et al.* 2008) bylo mezi 118 izoláty *S. aureus* prokázáno 45 kmenů rezistentních k alespoň jednomu aminoglykosidovému antibiotiku (38 %), z toho rezistenci pouze ke gentamicinu vykazovalo 11 izolátů (9 %). Mezi všemi těmito izoláty byl nejčastěji detekován gen *aacA-aphD* (13 izolátů) a gen *aadC* (12 izolátů).

V Jordánsku (Bdour *et al.* 2012) bylo rezistentních k aminoglykosidům 30 z 57 kmenů MRSA (53 %) a 15 ze 43 kmenů MSSA (33 %), přičemž ve většině případů byla zjištěna rezistence testovaného kmene ke gentamicinu, kanamycinu a tobramycinu současně. Všech 30 kmenů MRSA rezistentních k aminoglykosidům neslo gen *aacA-aphD*, 23 kmenů dále gen *aadC* a 17 kmenů gen *aphA3*. Všech 15 kmenů MSSA rezistentních k aminoglykosidům neslo gen *aacA-aphD*, 8 kmenů dále gen *aadC* a pouze 4 kmeny gen *aphA3*. Převážná většina kmenů nesla kombinaci dvou genů rezistence, a to většinou *aacA-aphD* v kombinaci s *aadC* (14 MRSA a 7 MSSA) nebo *aphA3* (10 MRSA a 3 MSSA), nebo kombinaci *aphA3* s *aadC* (pouze 4 MRSA).

Z uvedených studií vyplývá, že výskyt aminoglykosidové rezistence je signifikantně vyšší u MRSA, nicméně i u MSSA může rezistence k těmto antibiotikům dosahovat poměrně vysokých hodnot. Z determinant rezistence k aminoglykosidům je nejčastější kombinace fosfotransferázy a acetyltransferázy (gen *aacA-aphD*) a dále potom nukleotidyltransferáza kódovaná genem *aadC*.

3.4. KLONALITA *S. AUREUS*

Pro *S. aureus* je typické klonální šíření, kdy úspěšný klon (např. silně virulentní nebo multirezistentní) může být příčinou epidemie, zejména v nemocničním prostředí. Klonalita je významná především u kmenů MRSA, mezi kterými dominuje několik hlavních klonálních linií zodpovědných za většinu nemocničních epidemií po celém světě (Robinson a Enright, 2003).

Kmeny MRSA se snadno šíří i mezi zdravými lidmi. Často jsou (nebo se snadno mohou stát) multirezistentní k různým dalším antibiotikům, což znesnadňuje možnosti léčby. Dříve byl jejich výskyt spojován pouze s nemocnicemi a nozokomiálními infekcemi (ha-MRSA, *hospital-associated* MRSA), od 90. let se však po celém světě začaly vyskytovat také kmeny komunitní (ca-MRSA, *community-associated* MRSA), jejichž prevalence postupně roste a dochází k jejich průniku do nemocničního prostředí (co-MRSA, *community-onset* MRSA). Další skupinou jsou kmeny spojované se zvířaty, resp. živočišnou výrobou (la-MRSA, *livestock-associated* MRSA).

3.4.1. TYPIZACE KMENŮ *S. AUREUS*

K typizaci, tedy rozlišení mezi klonálními liniemi, lze použít principiálně odlišné metody – metody založené na makrorestrikční analýze genomu nebo metody založené na sekvenaci jednoho či více lokusů. „Zlatým standardem“ pro typizaci *S. aureus* je pulzní gelová elektroforéza (PFGE). Touto specificky uspořádanou elektroforézou jsou podle velikosti rozděleny velké fragmenty vzniklé naštěpením celé genomové DNA restrikční endonukleázou (princip a provedení viz kapitola 4.2.10.).

Multilokusová sekvenační typizace (MLST) využívá srovnání sekvencí sedmi *housekeeping* genů *S. aureus* s internetovou databází, na základě čehož je kmenu přiřazen určitý alelický profil odpovídající tzv. sekvenačnímu typu (ST). Podobné sekvenační typy jsou společně řazeny do tzv. klonálních komplexů (CC), pakliže mají minimálně 5 společných lokusů s alespoň jedním zástupcem daného CC. Příkladem jednolokusové sekvenační typizace, vycházející ze sekvence jediného lokusu, je *spa* typizace (princip popsán níže, provedení viz kapitola 4.2.11.).

TYPIZACE NA ZÁKLADĚ SEKVENACE GENU *SPA*

Gen *spa*, unikátní pro stafylokoky, kóduje povrchový protein A o velikosti 42 kDa, který je rovněž faktorem virulence zabraňujícím fagocytóze. Tento protein sestává z pěti konzervovaných domén a na jeho C-terminálním konci se nachází polymorfní region Xr, který je charakteristický výskytem variabilního počtu až 22 krátkých repetitiv (SSRs – *Short Sequence Repeats*) o délce nejčastěji 24 bp. Důležitý je nejen počet repetitiv, ale i jejich sekvence a pořadí. Polymorfismy jsou generovány delecemi, duplikacemi a bodovými mutacemi. Variability v této oblasti se využívá v epidemiologii při zjišťování klonality izolátů *S. aureus* pomocí tzv. *spa* typizace, kdy se sekvence polymorfního regionu převede na kód odpovídající určitému *spa* typu. *Spa* typy pak lze podle podobnosti uspořádat do vyšších jednotek, tzv. *spa* klonálních komplexů (*spa-clonal complex, spa-CC*). Průkaz genu *spa* navíc slouží jako druhová identifikace *S. aureus*.

V současné době je známo přes 15 tisíc různých *spa* typů a 680 různých repetitiv (k 20. 7. 2015, Ridom SpaServer), přičemž stále jsou detekovány nové, dosud nepopsané *spa* typy i repetice. Pouze 13 *spa* typů však má ve světě zastoupení alespoň 1 % či vyšší.

Detekovaný *spa* typ se může v průběhu chronické infekce měnit. Do dýchacích cest pacienta se např. dostane zcela jiný kmen, který koexistuje s kmenem původním, nebo jej zcela nahradí. Docházet však může také k přestavbě polymorfního regionu Xr genu *spa* stávajícího kmene, a to jak ke změnám v počtu repetitiv (vlivem replikačních chyb nebo rekombinace), tak ke změnám v sekvenci jednotlivých repetitiv (vlivem mutací). Nejčastěji dochází k inzercím či delecím různých repetitiv, případně jejich duplikaci. Bylo zjištěno, že k jedné takové mutační změně (obvykle delecí) dojde v průměru jednou za 70 měsíců trvání chronické infekce (Kahl *et al.* 2005).

Protein A hraje důležitou roli při vyvolání zánětu u pacientů s chronickou infekcí – podle počtu krátkých repetitiv se např. mění množství neutrofilů přicházejících do postižené tkáně. U zdravých jedinců nebo pacientů s akutní infekcí *S. aureus* bylo detekováno větší množství krátkých repetitiv v Xr oblasti (obvykle 9-10 repetitiv), než u pacientů chronicky a dlouhodobě infikovaných tímto patogenem (variabilní počet repetitiv). Dalo by se tedy zobecnit, že čím déle infekce trvá, tím

méně repetitivní bývá v Xr regionu detekováno. Ztráta SSR nebo obecně změna jejich počtu by tedy mohla být jedním ze způsobů adaptace stafylokoků (Garofalo *et al.* 2012).

3.4.2. VÝZNAMNÉ KLONÁLNÍ KOMPLEXY *S. AUREUS*

Prevalence klonů *S. aureus* se může lišit mezi jednotlivými zeměmi i v různých regionech každé země. Existuje však několik klonálních komplexů, jejichž šíření je natolik úspěšné, že se vyskytují mnohem častěji v rámci celého kontinentu nebo dokonce celosvětově. Důležité je i časové hledisko, neboť se neustále objevují nové, úspěšnější klony či klonální komplexy, které postupně mohou nahrazovat klony stávající.

V Nizozemsku bylo v roce 2004 analyzováno více než 1000 kmenů *S. aureus* (Melles *et al.* 2004). Hlavní detekované klonální komplexy odpovídaly v té době nejčastějším klonálním komplexům podle MLST databáze (<http://www.mlst.net>, definováno analýzou invazivních i nosičských kmenů *S. aureus* včetně MRSA, převážně z Velké Británie): CC8, CC30, CC5, CC22 a CC45. Zjevně se tedy tyto klonální komplexy úspěšně šíří mezi evropskými zeměmi a možná také celosvětově. Jako nejúspěšněji adaptované ke kolonizaci člověka se v této studii ukázaly komplexy CC30 a CC45, do kterých spadala téměř polovina všech nosičských neinvazivních izolátů (47%).

Při analýze 134 izolátů *S. aureus* ve Švédsku (Rasmussen *et al.* 2013) bylo detekováno 6 hlavních klonálních komplexů zahrnujících v sobě 84 % izolátů z celého testovaného souboru. Nejpočetněji zastoupené klonální komplexy byly CC30 a CC45. V dalších významných detekovaných komplexech CC5, CC8, CC15 a CC25 zase signifikantně převažovaly invazivní kmeny *S. aureus* oproti neinvazivním – do CC5 byla dokonce zařazena většina kmenů izolovaných od pacientů s infekční endokarditidou. Přestože byly invazivní kmeny nalezeny napříč všemi detekovanými klonálními komplexy, některé klonální linie se specifickými faktory virulence se zdály být úspěšnější ve vyvolávání invazivních onemocnění. Dalo by se tedy předpokládat, že invazivita kmene může souviset mj. s jeho klonalitou.

Nejčastěji detekované spa typy v Evropě jsou uvedeny v tabulce 7, a to včetně rozdělení podle citlivosti k oxacilinu na MRSA a MSSA (Grundmann *et al.* 2010). Podle stejné studie bylo v České republice mezi 94 izoláty MSSA z let 2006-2007 detekováno 64 různých spa typů, přičemž na prvních třech příčkách podle prevalence se umístily spa typy t015 a t130 (5,3%); t024, t122 a t1081 (4,3%); t056, t156, t491 a t1231 (3,2%). U 51 izolátů MRSA bylo detekováno 9 spa typů, nejčastěji t003 (66,7%), t032 (13,7%) a t002 (7,8%). Obecně byla zjištěna vyšší genetická diverzita mezi kmeny MSSA oproti MRSA, což potvrzuje klonální šíření kmenů rezistentních k oxacilinu (Grundmann *et al.* 2010, Rolo *et al.* 2012).

Tabulka 7: Deset nejčastěji detekovaných spa typů mezi invazivními kmeny MRSA a MSSA v 26 evropských zemích z let 2006-2007. Ke každému spa typu byl přiřazen sekvenční typ analýzou MLST nebo podle MLST databáze. Upraveno podle Grundmann et al. 2010.

POŘADÍ PODLE ČETNOSTI V EVROPE	MSSA		MRSA	
	SPA TYP	ST (MLST)	SPA TYP	ST (MLST)
1.	t002	ST-5, ST-231	t032	ST-22
2.	t084	ST-15, ST-18	t008	ST-8
3.	t015	ST-45	t041	ST-111, ST-228
4.	t091	ST-7	t003	ST-5, ST-225
5.	t012	ST-30	t002	ST-5, ST-231
6.	t127	ST-1	t067	ST-5, ST-125
7.	t008	ST-8	t001	ST-5, ST-222, ST-228
8.	t021	ST-30	t037	ST-239, ST-241
9.	t005	ST-22	t030	ST-239, ST-246
10.	t026	ST-45, ST-47	t024	ST-8

Mezinárodní evropská studie odhalila vysokou diverzitu mezi komunitními kmeny *S. aureus* (Rolo et al. 2012). Nejčastěji detekovanými klony mezi nimi byly ST-30, ST-121, ST-1, ST-7, ST-8, ST-15, ST-25, ST-59, ST-80, ST-97, ST-1472 a ST-1595, v případě komunitních kmenů MRSA šlo především o zástupce klonálního komplexu USA300 a Evropského klonu. U nemocničních kmenů *S. aureus* převažovaly klonální skupiny ST-45, ST-5, ST-22 a ST-36, u nemocničních kmenů MRSA zejména klony EMRSA-15 (ST-22) EMRSA-3 (ST-5), ST-5, ST-45, Brazilský klon (ST-239) a klony ST-111 a ST-125. Evropský klon (ST-80), který dříve v evropských zemích převažoval, je postupně vytlačován klonem USA300 (ST-8) a klony jemu příbuznými. Jde o významný nový trend v epidemiologii ca-MRSA v Evropě.

V České republice je situace podobná. Mezi komunitními kmeny je nyní nejčastěji detekován invazivní klon USA300 (ST-8 z klonálního komplexu CC8), který nahradil dříve dominantní Evropský klon (ST-80). Nemocniční kmeny spadaly nejčastěji pod Brazilský klon (ST-239), resp. jeho regionální variantu, tzv. Český klon (Melter et al. 2003), a dále pod Iberský klon (ST-247 z klonálního komplexu CC8). Od roku 2002 se mezi nemocničními kmeny zvyšuje prevalence kmenů z tzv. Rýnsko-hessenského klonu (*Rhine Hesse clone*, CC5, spa typ t003) a z klonu EMRSA-15 (CC22, spa typ t032) (Melter et al. 2003, 2006).

3.5. SMALL COLONY VARIANTS (SCV) *S. AUREUS*

S chronickou rekurentní infekcí *S. aureus* se pojí problematika výskytu „trpasličích“ variant této bakterie (SCV *S. aureus*), např. u osteomyelitidy, při infekci umělých chlopní nebo infekci dýchacích cest u pacientů s CF. Přejít k SCV fenotypu je obecně jedním ze způsobů perzistence bakterií v hostiteli (shrnující články Melter a Radojevič 2010, Tkadlec a Melter 2013).

Kolonie SCV *S. aureus* mají, na rozdíl od svých mateřských kolonií (NCV, *Normal Colony Variants*), drobnou velikost, jsou nepigmentované a vykazují obvykle sníženou hemolýzu. Tvarově lze rozlišit dva typy SCV kolonií – drobné tečkovité kolonie (*Pinpoint colonies*) přibližně 10x menší než mateřské, nebo kolonie tvaru „volského oka“ (*Fried Eggs colonies*) s vypouklou a pigmentovanější středovou částí (Kahl *et al.* 2003b). Mikroskopicky je patrná neúplná buněčná separace při dělení, což vede ke vzniku shluků nekompletně oddělených buněk. Po obarvení podle Grama se SCV *S. aureus*, na rozdíl od buněk NCV, jeví jako pleomorfní koky, kvůli čemuž mohou být mylně považovány např. za nepatogenní mikrokoky. Další příčinou možného přehlédnutí SCV *S. aureus* je skutečnost, že takto malé kolonie mohou být patrné až po delší kultivaci a snadno je přerůstají normálně rostoucí bakterie včetně mateřských kolonií *S. aureus*. Rovněž standardní rozlišovací testy (katalázový, koagulázový) se mohou jevit jako falešně negativní. Záchyt, izolace a identifikace SCV v rutinní klinické praxi jsou proto velmi problematické. Prevalence kmenů SCV detekovaných mezi pacienty se stafylokokovou infekcí je uveden v tabulce 1 (viz kapitola 3.2.; při detekci SCV se jednalo většinou o koinfekci mateřským kmenem i jeho SCV variantou).

Další vlastností kmenů SCV, komplikující léčbu pacienta, je jejich schopnost intracelulární perzistence v eukaryotických buňkách (Kahl *et al.* 1998, Tuchscherer *et al.* 2010) a zároveň snížená citlivost k mnohým antibiotikům. Kvůli útlumu produkce faktorů virulence je zhoršeno i jejich rozpoznání imunitním systémem hostitele. Pokud jde o dopady na zdraví pacienta, je záchyt SCV *S. aureus* spojován se zhoršením jeho plicních funkcí a celkového stavu (Wolter *et al.* 2013).

PŘÍČINY SCV FENOTYPU

Příčiny SCV fenotypu mohou být rozmanité: zahrnují mutace v genech pro komponenty elektron-transportního řetězce, ale také indukci některými antibiotiky, triklosanem nebo chladovým stresem (shrnující článek Kahl 2014). V kontextu cystické fibrózy se lze nejčastěji setkat s SCV kmeny auxotrofními k tymidinu nebo méně často s SCV kmeny s defektním elektron-transportním řetězcem (auxotrofní k heminu či menadionu), které jsou schematicky zobrazeny na obr. 5. Kmeny auxotrofní k menadionu nedokážou syntetizovat menachinon, kmeny auxotrofní k heminu zase

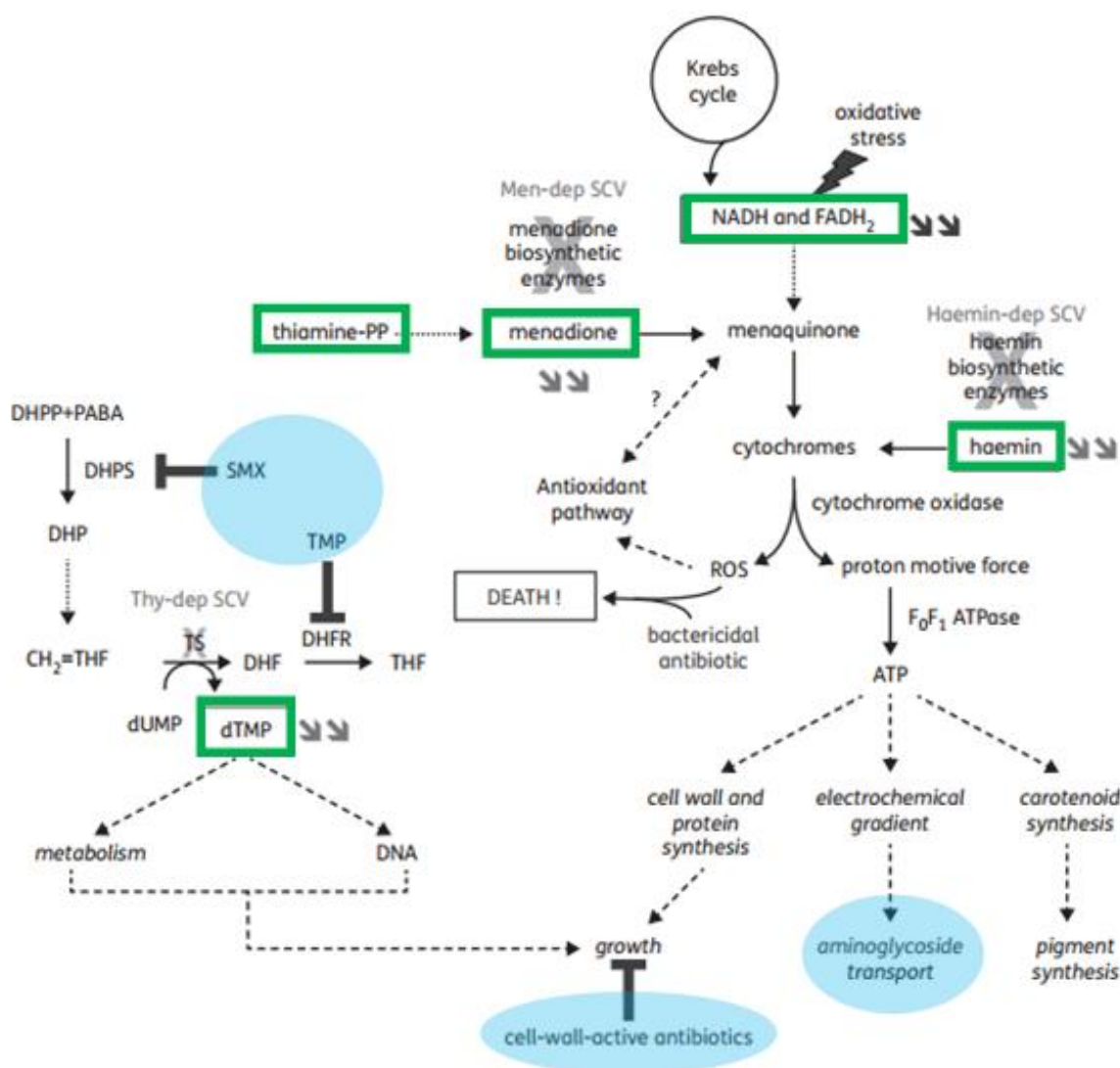
cytochromy, a to z důvodu mutací v genech pro enzymy účastnící se biosyntézy těchto přenašečů (*hemA*, *hemH*, *menB*). Tyto mutanty mají snížený transmembránový potenciál, což mj. snižuje pronikání pozitivně nabitých substrátů, jako jsou antimikrobní peptidy, defenziny nebo aminoglykosidy (gentamicin). Vzácně se mohou vyskytnout kmeny s auxotrofií k thiaminu, které jsou podskupinou auxotrofů k menadionu (thiamin-pyrofosfát je kofaktor syntézy menadionu). Auxotrofie k tymidinu bývá zapříčiněna mutací v genu pro tymidylát syntázu (*thyA*), enzym katalyzující přeměnu dUMP na dTMP (Chatterjee *et al.* 2008). Tetrahydrofolát, vedlejší produkt této reakce, tedy nevzniká, a v bakteriální buňce proto chybí cíl účinku některých antibiotik, např. sulfonamidů (trimetoprim-sulfametoxazol neboli kotrimoxazol). Ke kotrimoxazolu jsou tymidin-auxotrofní kmeny *S. aureus* rezistentní, a proto léčba stafylokokové infekce tímto antibiotikem může vést k selekci SCV kmenů.

SCV kmeny jsou typicky nestabilní, takže za příznivých podmínek snadno revertují zpět k NCV fenotypu, nicméně pod selekčním tlakem se stabilita SCV kmenů zvyšuje. Jako selektující faktor může sloužit kompetice s jiným patogenem (v kontextu CF je to typicky *P. aeruginosa*; Hoffman *et al.* 2006, Biswas *et al.* 2009) anebo antibiotická léčba, která je u pacientů s CF často dlouhotrvající, opakující se a poměrně drastická. V poslední době bylo prokázáno, že koexistence SCV i NCV kolonií jednoho bakteriálního kmene a možnost „přepínání“ (*switch*) mezi nimi je součástí běžného exponenciálního růstu *S. aureus*, a to bez jakéhokoli selekčního tlaku (Edwards 2012, Tuchscher *et al.* 2011).

V této práci definujeme jako SCV takové kolonie, které i) vykazují v důsledku snížené růstové rychlosti drobnou velikost s obvykle méně pigmentovanými i méně hemolyzujícími koloniemi, a které ii) jsou auxotrofní k heminu, menadionu nebo tymidinu a na chudém médiu typu MH agaru rostou pouze při suplementaci tímto auxotrofním požadavkem. Druhá z uvedených charakteristik může být doložena také průkazem mutace v genech *hemA*, *hemH*, *menB* nebo *thyA*.

Obr. 5: Mechanismy způsobující SCV fenotyp u *S. aureus* a jejich souvislost se sníženou citlivostí k některým antibiotikům. SCV s deficičním elektron transportním řetězcem mají narušenou syntézu menadionu a heminu, což vede k nižší produkci ATP a tím také pomalejší růstové rychlosti. Ovlivněno je i působení antibiotik zacílených na dělicí se buňky (betalaktamy) a také např. aminoglykosidů, které vstupují do buněk obtížněji kvůli redukcí transmembránového potenciálu. Obecně mohou antibiotika u hemin- a menadion-dependentních SCV působit méně baktericidně kvůli snížené produkci kyslíkových radikálů (ROS).

Tymidin-dependentní SCV kmeny nedokážou přeměnit dUMP na dTMP kvůli mutované tymidylátsyntáze (TS). Kofaktor této reakce, dihydrofolát (DHF), je dihydrofolátreduktázou (DHFR) redukován na tetrahydrofolát (THF). Para-aminobenzoová kyselina (PABA) a dihydropteridin pyrofosfát (DHPP) jsou sloučeny dihydropteroát syntázou (DHPS) na dihydropteroát (DHP). Tymidin-dependentní kmeny vykazují rezistenci k antifolátovým látkám jako je sulfonamid sulfametoxazol (SMX) zacílený proti DHPS, a diaminopyridinům jako např. trimetoprim (TMP) zacílený proti DHFR.



Legenda:

Tymidin-dependentní SCV (Thy-dep SCV), menadion-dependentní SCV (Men-dep SCV), hemin-dependentní SCV (Haemin-dep SCV).

Modře vyznačena antibiotika se sníženým účinkem.

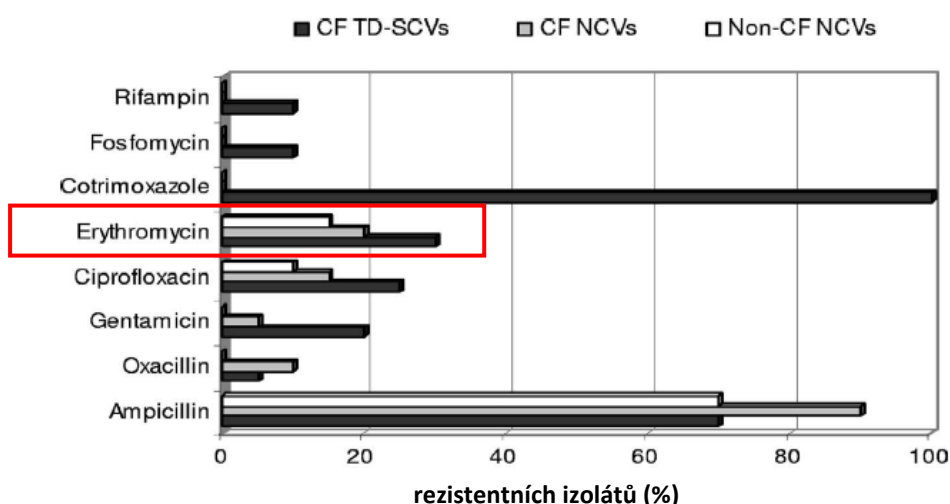
Zelené rámečky značí metabolity, jejichž koncentrace je u příslušných SCV snížena (nedokážou si je vyprodukovat a jsou tedy závislé na jejich přísunu z okolního prostředí) důsledkem mutace enzymů nutných k jejich syntéze (mutované enzymy jsou šedě přeškrtnuty).

(převzato z Garcia et al. 2013)

REZISTENCE SCV KMENŮ K MLS_B ANTIBIOTIKŮM

Nejsou to však pouze aminoglykosidy, betalaktamová nebo antifolátová antibiotika, ke kterým vykazují SCV kmeny *S. aureus* zvýšenou rezistenci. V německé studii byla srovnávána rezistence 24 izolátů SCV a 110 izolátů NCV, v obou případech od pacientů s CF (Besier *et al.* 2007). Kmeny SCV *S. aureus* vykazovaly signifikantně vyšší (přibližně dvojnásobnou) rezistenci k erytromycinu i klindamycinu než kmeny NCV.

K podobným závěrům došla tatáž autorka v pozdější studii (Besier *et al.* 2008), kdy porovnávala vlastnosti izolátů *S. aureus* ze tří skupin: s normálním fenotypem od pacientů s CF („CF CF NCV“), s SCV fenotypem od pacientů s CF („CF SCV“) a s normálním fenotypem mimo kontext CF („non-CF NCV“). SCV izoláty byly ve všech případech auxotrofní k tymidinu. Rezistence ke gentamicinu, erytromycinu, fosfomycinu, ciprofloxacinu a rifampicinu byla u SCV CF kmenů signifikantně vyšší než ve zbylých dvou skupinách s normálním fenotypem (obr. 6). Příčinou rezistence k makrolidům byly nejčastěji geny *ermA* nebo *ermC*, a to u všech rezistentních NCV non-CF kmenů, u 3 ze 4 rezistentních NCV CF kmenů a u poloviny (3 z 6) SCV CF kmenů s MLS_B rezistencí. U zbylých třech SCV kmenů byly příčinou této rezistence ribozomální bodové mutace A2058G a A2058T, přičemž tyto kmeny vykazovaly hypermutabilitu. Autoři spojují vznik tymidin-dependentních SCV kmenů s vystavením selektivnímu tlaku při léčbě kotrimoxazolem, a současně s mutacemi v MMR systému vedoucími k replikačním chybám (Besier *et al.* 2008, detailněji v následující kapitole 3.6.).



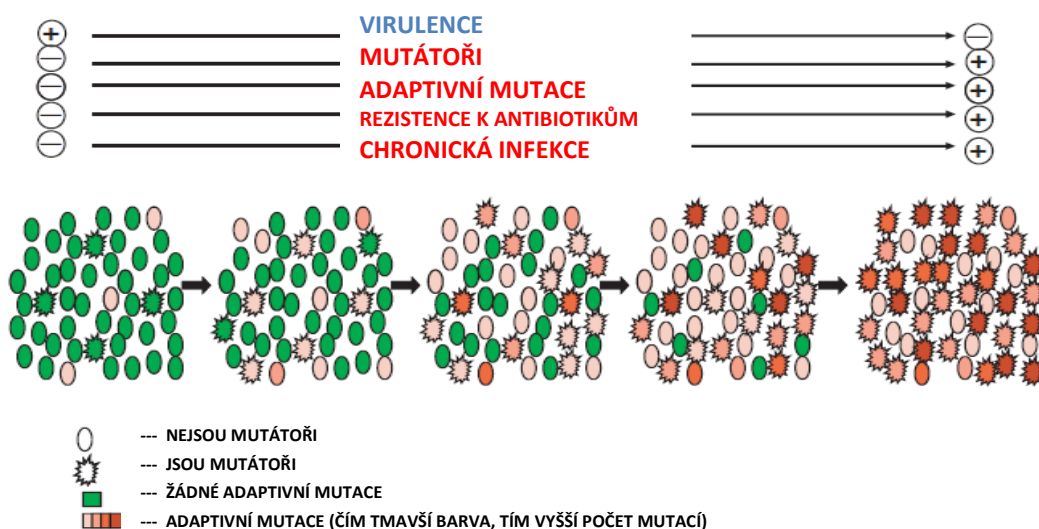
Obr. 6: Srovnání prevalence rezistence mezi třemi skupinami izolátů *S. aureus*: s normálním fenotypem od pacientů s CF („CF NCV“ vyznačeny šedě), s tymidin-dependentním SCV fenotypem od pacientů s CF („CF TD-SCV“ vyznačeny černě) a s normálním fenotypem mimo kontext CF („non-CF NCV“ vyznačeny bíle).

3.6. HYPERMUTABILITA

Jedním z dalších způsobů adaptace bakterií včetně *S. aureus* k prostředí je dočasný přechod k hypermutabilitě. Jako mutátor (resp. hypermutátor) je označován bakteriální kmen, u kterého se vyskytují mutace s mnohem vyšší četností než u *wild type* kmenů.

3.6.1. HYPERMUTABILITA JAKO PROSTŘEDEK ADAPTACE

Přestože většina mutací je pro jejich nositele škodlivá a někdy dokonce letální, vyskytnou se zřídka i mutace pozitivní (tzv. adaptivní), které se přenášejí do dalších generací a vedou tak k evoluci dané populace. Zvýšení mutační frekvence je sice za normálních podmínek nevýhodné, neboť hlavním důsledkem je akumulace škodlivých mutací, ve stresujících podmínkách to však pro bakterie může být jediná možnost, jak přežít – zvýšit pravděpodobnost vzniku pozitivní mutace (viz obr. 7; Alcalá-Franco *et al.* 2012). Mena tuto skutečnost kvantifikoval: zatímco u skupiny „nemutátorů“ vzniklo průměrně 0,25 pozitivní mutace za rok infekce (ve 34 testovaných genech), u mutátorů to bylo v průměru přes 3 takové mutace za rok infekce – četnost výskytu adaptivní mutace se tedy díky hypermutabilitě zvýšila až 13x (Mena *et al.* 2008).



Obr. 7: Schematické znázornění *P. aeruginosa* v průběhu chronické plicní infekce u pacienta s CF, demonstrující roli mutátorů jakožto katalyzátorů evoluce bakteriální populace. Po objevení mutátorů narůstá počet adaptivních mutací vedoucích např. k útlumu virulence nebo ke snížení citlivosti k antibiotikům (převzato z Oliver a Mena, 2010).

Přestože postupně většina hypermutabilní populace vymře na následky delecí a jiných škodlivých mutací, její zlomek se udrží díky tomu, že se dokázal pohotově adaptovat, a může dát vzniknout nové velké populaci. Hypermutabilita tak poskytuje bakteriím možnost dočasně využít

zvýšenou mutační frekvenci ve svůj prospěch, a to především v případech kolonizace nové niky a přizpůsobování se novým či náhle nepříznivým podmínkám.

Za jeden z nejzávažnějších důsledků hypermutability lze (zejména v souvislosti s chronickými infekcemi) označit šíření rezistence k antibiotikům – s hypermutabilitou je spojován např. vznik kmenů VRSA rezistentních kromě vankomycinu také k linezolidu (Tazi *et al.* 2013) nebo vznik multirezistence u *P. aeruginosa* (Maciá *et al.* 2005, Hogardt *et al.* 2007). Hypermutátoři se mohou rychleji adaptovat na oxidativní stres nebo na imunitní odpověď hostitele. Může docházet k adaptaci metabolismu, např. posílení mikroaerofilní nebo anaerobní respirace (Hoboth *et al.* 2009) či k útlumu virulence (Smith *et al.* 2006). Bylo také zjištěno, že bakteriální populace infikovaná bakteriofágem se vyvíjí v čase mnohem rychleji než neinfikovaná populace (Pal *et al.* 2007). Koevoluce s parazitem je tak dalším z případů, kdy rychlá adaptace umožněná právě hypermutabilitou může rozhodovat o přežití bakteriální populace.

Je-li hypermutátor přenesen do dalšího nového prostředí, např. přirozeného environmentálního, vykazuje sníženou fitness oproti *wild type* jedincům (Hogardt *et al.* 2007). Hypermutátor je tedy hůře šířitelný a znevýhodněný při přenosu do jiného prostředí než primárního, ke kterému se adaptuje nebo adaptoval (Mena *et al.* 2007). Jakmile je populace dostatečně adaptována k danému prostředí, začíná být hypermutabilita opět nevýhodná. Jedinou možností je zpětně vyředit hypermutátory a obnovit *wild type* mutační frekvenci.

3.6.2. PŘÍČINY HYPERMUTABILITY

Mutační frekvence hypermutátorů se zvyšuje z normální hodnoty 10^{-10} na nukleotid u *E. coli* až o několik řádů. Důvodem je narušení reparačních mechanismů bakteriální buňky, které za normálních okolností předcházejí spontánním chybám v buněčné DNA, nebo tyto chyby (vzniklé zejména při replikaci) opravují: *in situ proofreading* samotnou replikující DNA polymerázou III, přesný výběr bazí inkorporovaných do nově syntetizovaného vlákna DNA, postreplikační oprava chybného párování tzv. MMR systémem (*Methyl-Directed Mismatch Repair*) či GO systémem (8-oxo-deoxyguanin) nebo také enzymy zabraňující oxidativnímu poškození DNA (kataláza, superoxid dismutáza). Zvýšení mutační frekvence tedy spočívá v tom, že spontánní mutace u hypermutátorů (narozdíl od *wild type* kmenů) nejsou efektivně opravovány. Takové geny, jejichž mutace může vyvolat nefunkčnost opravných mechanismů buňky, se někdy nazývají mutátorové geny (např. *mutS*, *mutL*, *mutT*, *sodA*, *sodB*, *oxyR*). Vedle toho rozlišujeme pouze dočasné (*transient*) hypermutátory, u nichž může být hypermutabilita indukovaná např. poškozením DNA nebo silnými dlouhodobými dávkami antibiotik, kdy je v rámci SOS odpovědi aktivována některá z chybujících (tzv. *error-prone*) DNA polymeráz jako jsou DNA polymeráza IV nebo V.

MMR-DEFICIENTNÍ HYPERMUTÁTOŘI

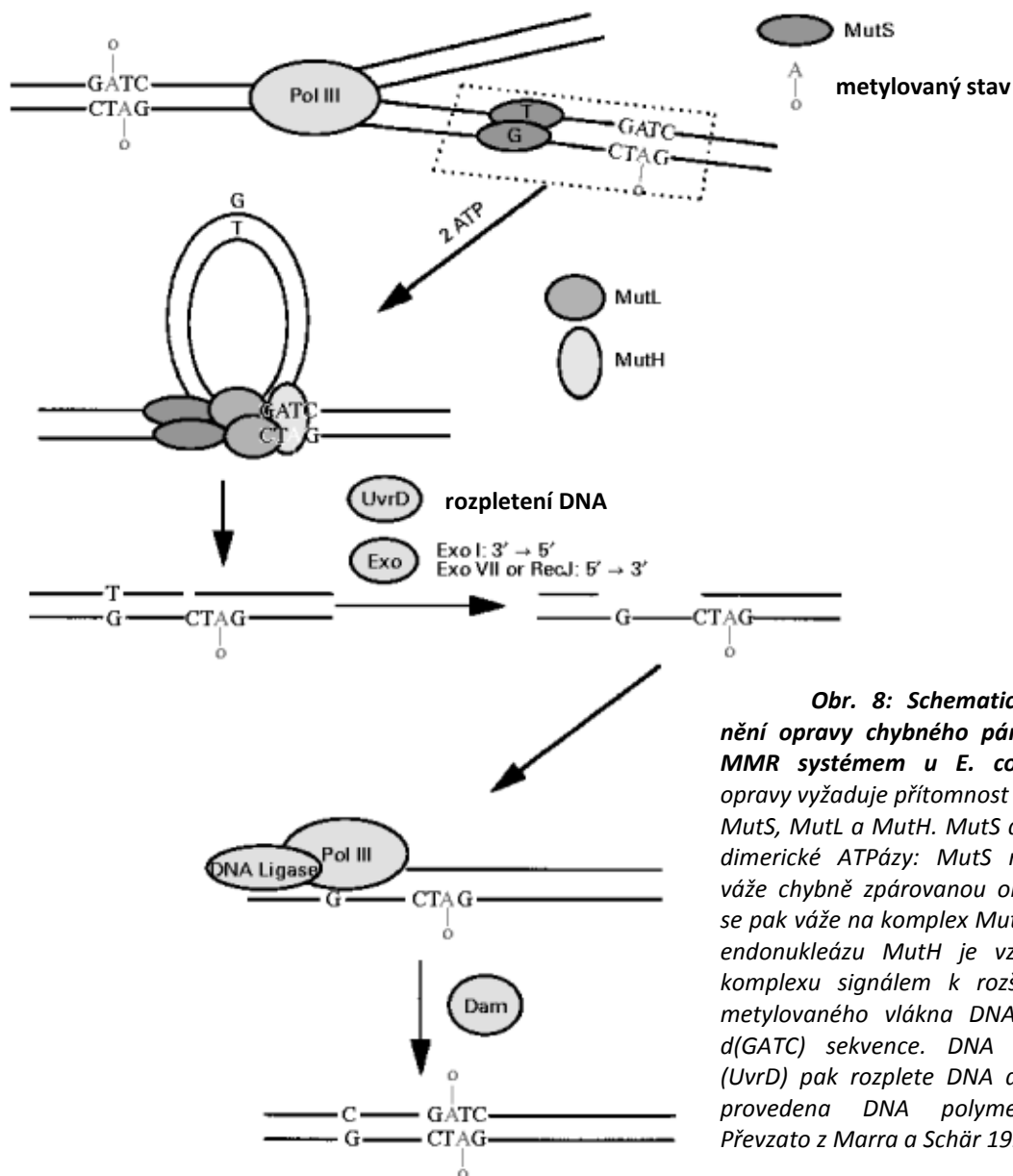
V kontextu CF se nejčastěji lze setkat s hypermutátory s narušeným MMR systémem. Tento reparační systém je vysoce konzervovaný. U různých kmenů *S. aureus* byla prokázána mezi jeho nejdůležitějšími komponentami homologie 99 % a vyšší (Besier *et al.* 2008). Komponenty MMR systému opravují chyby při replikaci – naleznou na nemetylovaném vlákně DNA nesprávně zařazený nukleotid, vyštěpí jej a zařadí správně (schematické znázornění na obr. 8).

Klíčovou roli zde hrají proteiny MutS, MutL, MutH a helikáza II (*uvrD*). Několikastupňový opravný proces začíná navázáním MutS dimeru do místa, kde došlo k chybnému párování. Následuje ATP závislé navázání MutL dimeru a komplex MutS₂-MutL₂-DNA posléze aktivuje doplňkovou endonukleázovou aktivitu proteinu MutH. Ten nastříhne nemetylované dceřinné vlákno DNA (naproti metylovanému GATC). Helikáza II rozplete DNA, následuje degradace DNA od stříhu po chybu a vzniklá mezera je dosyntetizována polymerázou III a zaligována.

Na počátku této kaskády oprav stojí Dam metyláza (DNA-adenin metyláza), která metyluje N6 pozici adeninových zbytků v GATC oblastech, a to post-replikačně. Při replikaci je tedy DNA v hemimetylovaném stavu – mateřské vlákno je metylované, dceřinné zatím nemetylované. Pouze tak lze zajistit, aby bylo opraveno nově syntetizované vlákno podle vlákna mateřského, nikoli naopak. Pokud nedojde k opravnému zásahu MMR systému ve chvíli, kdy je DNA hemimetylována, pak je mutace fixována, neboť později už MMR systém nedokáže rozlišit mezi vlákny. Přestože tento systém metylace platí pouze pro gramnegativní bakterie, u grampozitivů se vyvinuly analogické mechanismy rozlišování mezi vlákny DNA.

Vedle opravné aktivity se uvádí, že Mut komponenty MMR systému fungují rovněž jako inhibitory homologní rekombinace. MMR systém by tedy mohl být jednou z hlavních bariér chránících bakterie před nežádoucí mezidruhovou rekombinací.

Různé bodové mutace v konzervovaných oblastech genů pro komponenty MMR systému, zejména *mutS* (2619 bp, 872 aminokyselin) a *mutL* (2010 bp, 669 aminokyselin) vedou k narušení reparační kaskády a v důsledku potom nemohou být opravovány chybně zařazené nukleotidy, ale ani krátké delece či inserce. U MMR-deficientních hypermutátorů je zřejmě navíc usnadněna homologní rekombinace, neboť nevyžadují tak přesnou homologii pro rekombinaci mezi dvěma komplementárními vlákny a proto ochotněji přijmou cizorodou DNA horizontálním genovým přenosem (např. získají novou determinantu rezistence). U grampozitivních bakterií však tato úloha MMR systému nebyla zcela prokázána (Prunier a Leclercq 2005).

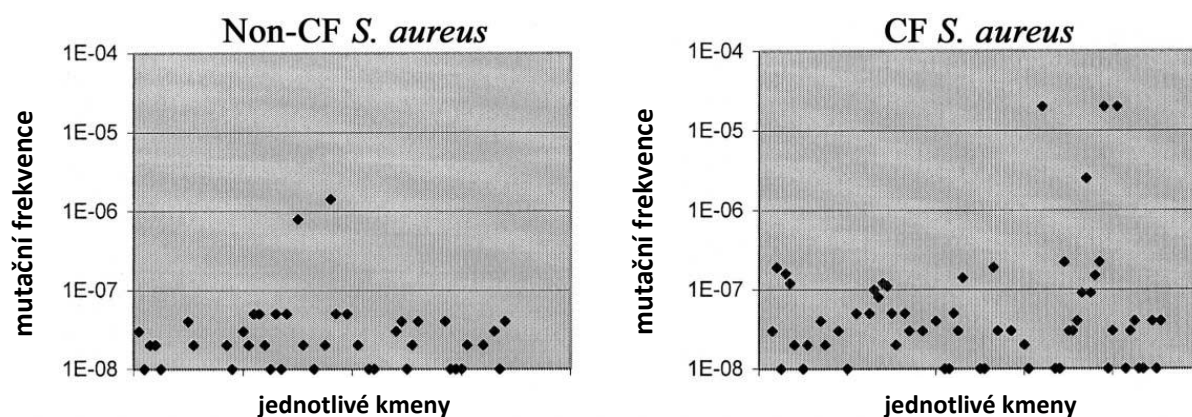


Obr. 8: Schematické znázornění opravy chybného párování bází MMR systémem u *E. coli*. Iniciace opravy vyžaduje přítomnost komponent MutS, MutL a MutH. MutS a MutL jsou dimerické ATPázy: MutS rozpozná a váže chybně zpárovanou oblast, MutL se pak váže na komplex MutS-DNA. Pro endonukleázu MutH je vznik tohoto komplexu signálem k rozštěpení nemetylovaného vlákna DNA v blízkosti d(GATC) sekvence. DNA helikáza II (UvrD) pak rozplete DNA a oprava je provedena DNA polymerázou III. Převzato z Marra a Schär 1999.

3.6.3. PREVALENCE HYPERMUTABILITY

Prevalence mutátorů v přirozeném prostředí byla poprvé zkoumána v 90. letech 20. století, kdy bylo v populaci salmonel a *E. coli* detekováno 1 % hypermutátorů (LeClerc *et al.* 1996). Nečekaně vysoký podíl hypermutátorových kmenů (36 %) byl později objeven mezi kmeny *P. aeruginosa* vyvolávajícími chronické respirační infekce u pacientů s CF (Oliver *et al.* 2000). Byla vyslovena hypotéza, že specifické prostředí plic pacientů s CF by mohlo u přirozených bakteriálních populací selektovat mutabilní kmeny. Později se ukázalo, že *S. aureus* a *H. influenzae* izolované od pacientů s CF jsou také často hypermutabilní (Prunier *et al.* 2003, Roman *et al.* 2004). Hypermutabilní kmeny pseudomonády byly nalezeny také u pacientů s jinými chronickými plicními onemocněními; naopak mezi kmeny pseudomonády od pacientů s akutní infekcí byla prevalence hypermutability velmi nízká (Gutierrez *et al.* 2004).

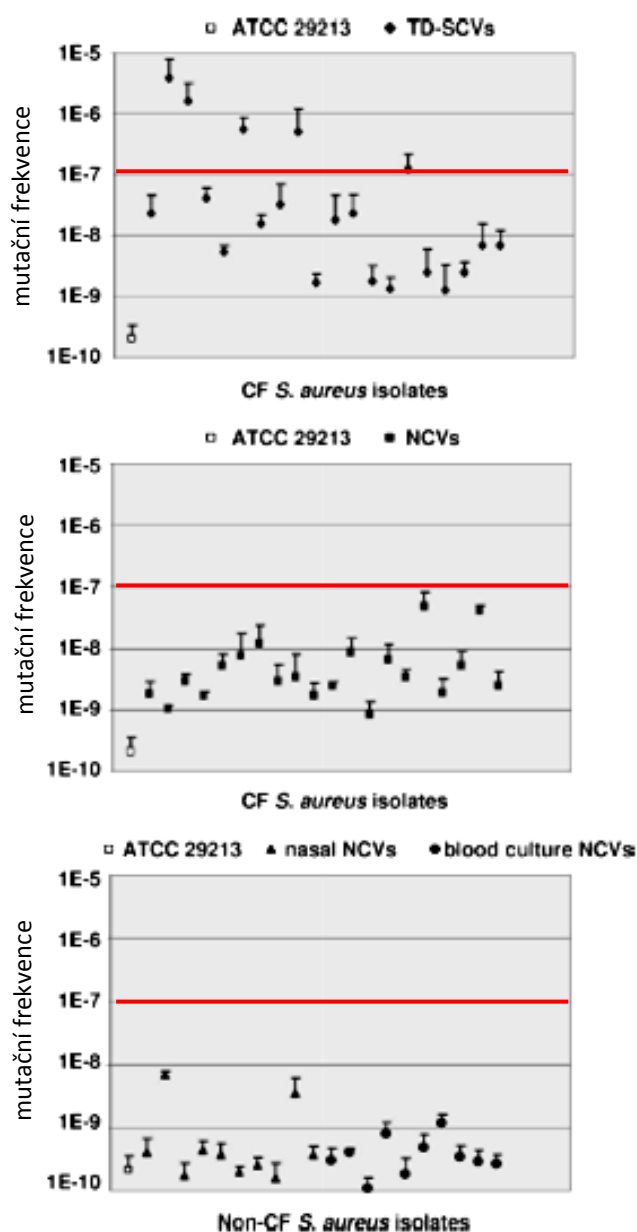
V roce 2003 bylo provedeno srovnání mutability *S. aureus* od pacientů s CF a mimo kontext CF (obr. 9; Prunier *et al.* 2003). Mutabilita *S. aureus* od pacientů s CF byla signifikantně vyšší – hypermutabilitu vykazovalo 14,6 % kmenů od pacientů s CF (13 z 89) a 1,4 % kmenů nesouvisejících s CF (1 ze 74). Jako mutátorové byly označeny kmeny s mutační frekvencí 1×10^{-7} a vyšší. U 8 z 15 hypermutabilních kmenů stály za zvýšenou mutační frekvencí mutace lokalizované obvykle v C-terminální oblasti genu *mutS* (MMR systém), vedoucí k záměnám aminokyselin ve struktuře kódovaného proteinu. U dvou kmenů od různých pacientů (jednoho hypermutátorového a druhého, jehož mutační frekvence sice nedosáhla na hranici hypermutability, avšak nesl četné mutace v 23S rRNA) byly detekovány např. Asn181His, Asn373Asp, Thr415Met nebo Leu811Ser, což naznačuje klíčovou roli mutovaných aminokyselin pro funkci kódovaného proteinu. Hypermutabilní kmeny, u kterých nebyly detekovány mutace v genu *mutS*, mohou nést mutace v genu *mutL* nebo v jiných mutátorových genech (Prunier *et al.* 2003).



Obr. 9: Mutační frekvence u *S. aureus* od pacientů s CF (vpravo) a mimo kontext CF (vlevo). Jako hypermutabilní byly označeny kmeny s mutační frekvencí 1×10^{-7} a vyšší. Na agarovou misku obsahující rifampicin bylo přeneseno 10^8 buněk *S. aureus* a po 48 hodinách inkubace při 37 °C byl spočítán počet vyrostlých kolonií, z něhož byla odvozena mutační frekvence srovnáním s původním množstvím naneseného vzorku. Každý bod v grafu představuje průměrnou hodnotu mutační frekvence získanou 3 nezávislými měřeními. Převzato z Prunier 2003.

V již zmiňované německé studii (Besier *et al.* 2008) byly srovnávány vlastnosti izolátů *S. aureus* ze tří skupin: s tymidin-dependentním SCV fenotypem od pacientů s CF („CF SCV“), s normálním fenotypem od pacientů s CF („CF NCV“) a s normálním fenotypem mimo kontext CF („non-CF NCV“). Do každé skupiny bylo vybráno 20 izolátů. Mutační frekvence izolátů od pacientů s CF byla signifikantně vyšší než u non-CF izolátů (obr. 10). Hlavní rozdíl mezi CF-SCV a CF-NCV pak spočíval v tom, že mezi tymidin-auxotrofními kmeny se vyskytly silně hypermutabilní kmeny. Detekováno bylo 5 silných hypermutátorů ve skupině tymidin-dependentních SCV od pacientů s CF (mutační frekvence 1×10^{-7} a vyšší), zatímco žádní silní hypermutátoři ve skupině CF NCV ani ve skupině non-CF NCV. Následnou sekvenací genů *mutS* a *mutL* šesti izolátů s nejvyšší mutační

frekvencí z každé skupiny byly zjištěny známé mutace zodpovědné za hypermutabilní fenotyp pouze ve skupině SCV izolátů, a to v 5 ze 6 případů. Ve skupinách NCV izolátů byly detekovány v několika případech mutace neznámého významu (2 ze 6 izolátů CF NCV, 1 ze 6 izolátů non-CF NCV). Většina mutací v genu *mutL* byla detekována v pozicích 345-388, dále šlo často o delece nebo inserce vedoucí k posunu čtecího rámce nebo vytvoření předčasného terminačního kodonu. Hypermutabilita byla označena jako způsob adaptace s možností vzniku rezistence k antibiotikům anebo přechodu k chronické infekci.



Obr. 10: Frekvence mutací u tří skupin kmenů *S. aureus*.

Shora: tymidin-dependentní SCV kmeny od pacientů s CF, normální (NCV) kmeny od pacientů s CF a NCV kmeny od pacientů bez CF.

Každý černě vyznačený bod symbolizuje průměrnou mutační frekvenci jednoho kmene z dané skupiny, bílý bod je vždy referenční kmen ATCC 29213 *S. aureus*.

Vyšší mutační frekvence byla prokázána u mnoha kmenů spojených s CF, nicméně rozdíl mezi skupinami SCV a NCV kmenů v kontextu CF nebyl signifikantní. Silní hypermutátory (mutační frekvence 10^{-7} a vyšší) se však vyskytli pouze ve skupině SCV kmenů. Převzato z Besier et al. 2008.

Prevalence hypermutátorů však může záviset na mnoha proměnných, od metod použitých k jejich detekci až po odlišnosti v konsenzech použitých antibiotik v jednotlivých centrech CF. Existují i studie s opačnými výsledky, kdy např. O'Neill a Chopra v souboru 49 kmenů *S. aureus* od pacientů s CF nenašli žádného silného hypermutátora (O'Neill a Chopra 2002).

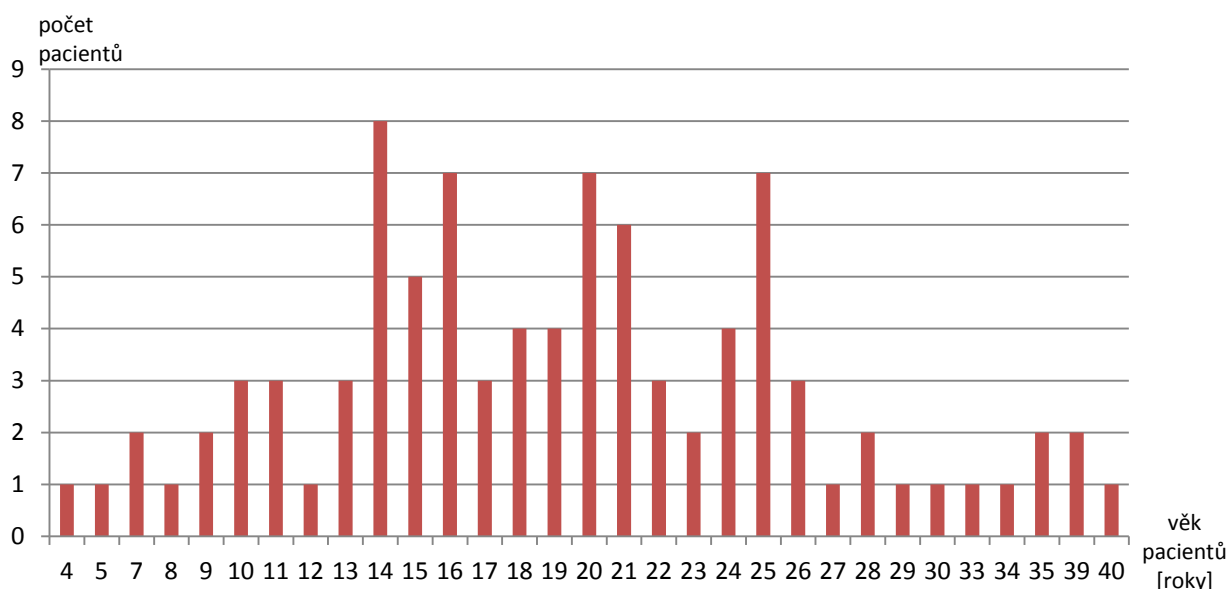
4. MATERIÁL A METODY

4.1. MATERIÁL

4.1.1. KLINICKÉ IZOLÁTY *S. AUREUS* Z DÝCHACÍCH CEST PACIENTŮ S CF

Testované izoláty *S. aureus* pocházejí z klinických vzorků, konkrétně ze sputa pacientů s cystickou fibrózou, jehož odběr je součástí pravidelných kontrol jejich stavu v Centru CF v Motole. K 6. 8. 2014 zde bylo v péči 318 pacientů (125 dospělých) z celkových 589 v ČR (242 dospělých), ostatní pacienti jsou v péči center CF v Brně, Olomouci, Hradci Králové a Plzni (Věstník MZČR 2012).

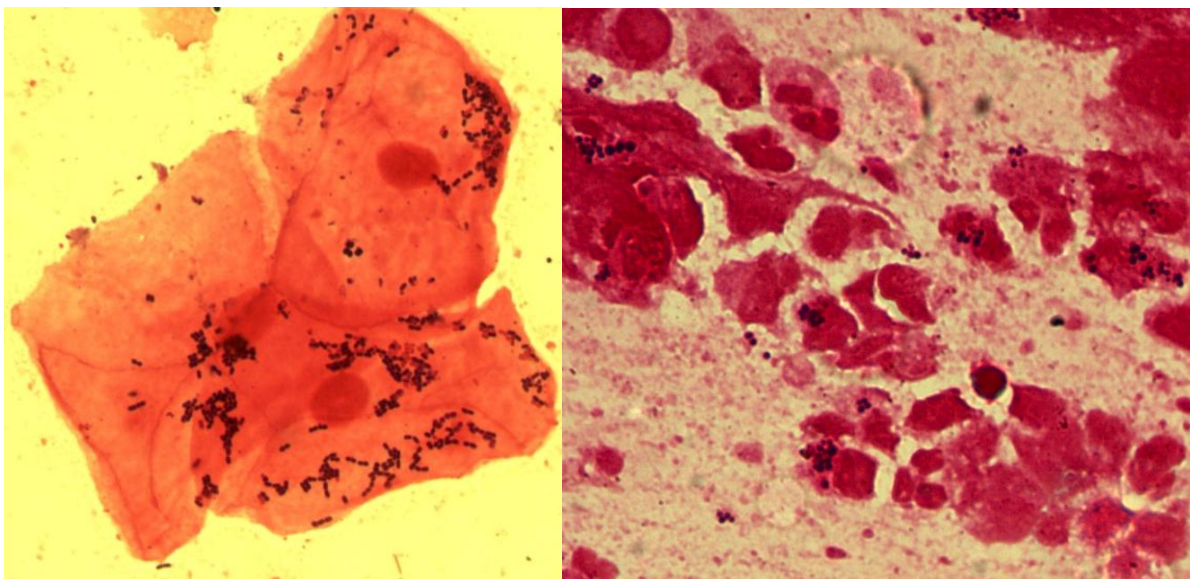
V případě kultivačního záchytu *S. aureus* a druhové identifikace tohoto patogenu pomocí hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF jsme všechny detekované izoláty systematicky uchovávali ve sbírce Ústavu lékařské mikrobiologie 2. LF UK a FN Motol, a to od června 2011. V rámci této diplomové práce byly analyzovány vybrané izoláty *S. aureus*, pocházející z období od června 2011 do konce prosince 2013, které byly zachyceny u celkem 92 pacientů, tedy u třetiny (29 %) všech motolských pacientů s CF. U 85 pacientů šlo o chronickou infekci *S. aureus*, tj. tato bakterie byla přítomna ve více než polovině vzorků sputa odebraných za posledních 12 měsíců, přičemž během této doby byly provedeny minimálně 4 odběry (Zolin *et al.* 2014).



Obr. 11: Pacienti s cystickou fibrózou v péči Centra CF v Motole se zachycenou stafylokokovou infekcí seřazení podle věku. Nejstaršímu pacientovi se stafylokokovou infekcí, který je sledován v Centru CF v Motole, je 40 let, nejmladšímu 4 roky (údaje aktualizované k 1. 6. 2014).

Izoláty pro budoucí analýzu jsme vybírali podle několika kritérií: podle kvality odebraného vzorku sputa, podle časového hlediska a podle stability profilu rezistence izolátů od daného

pacienta. Citlivost na antibiotika byla měřena v rámci standardního laboratorního vyšetření a znovu ověřena během této studie. Kvalita sputa byla posuzována mikroskopováním preparátu obarveného podle Grama, přičemž vhodný vzorek, pocházející z DCD, obsahoval leukocyty (do 10 leukocytů v zorném poli – nízká kvalita; 10-25 leukocytů v zorném poli – střední kvalita; nad 25 leukocytů v zorném poli – vysoká kvalita), dále malý počet dlaždicovitých epiteliálních buněk a grampozitivní koky. Vyřazeny byly naopak vzorky s velkým počtem epitelií, původem z horních dýchacích cest (s výjimkou malých dětí, u kterých často není odběr z DCD možný).



Obr. 12: Mikroskopie sputa pacientů s CF: Vlevo nevhodný vzorek se zastoupením velkých dlaždicovitých epitelií původem z horních dýchacích cest a přítomnost grampozitivních koků v řetězích (pravděpodobně komenzální streptokoky), vpravo naopak vzorek sputa požadované kvality z dolních cest dýchacích, obsahující grampozitivní koky ve shlucích (pravděpodobně stafylokoky) a velké množství leukocytů, indikátorů zánětlivé reakce.

Více izolátů od jednoho pacienta jsme do testovaného souboru zahrnuli v případě, že i) časová prodleva mezi jednotlivými odběry byla delší než 6 měsíců, nebo ii) se měnil profil rezistence jednotlivých izolátů (indikátor genetické nebo klonální změny), nebo iii) u tohoto pacienta byl detekován SCV izolát, jejichž studium bylo dílčím cílem této práce. Tímto způsobem bylo vybráno 338 izolátů, v průměru tedy přibližně 4 vzorky od jednoho pacienta za sledované období s rozpětím od 1 vzorku na pacienta (v případě 9 pacientů) po více než 10 vzorků na pacienta. Vzhledem k tomu, že jsou v této práci pro ucelenost uvedeny výsledky analýz všech testovaných vzorků, používáme při procentuálním vyjadřování jednotlivých charakteristik přepočítání na pacienty, nikoli na samotné vzorky.

Vzorky jsou číslovány podle pořadového čísla pacienta lomeného číslem odběru. V několika případech se analyzovaný izolát diferencoval na fenotypově odlišné morfotypy A a B s různou mírou hemolýzy nebo pigmentace. U SCV kmenů byl analyzován i jejich mateřský kmen (NCV).

4.1.2. REFERENČNÍ KMENY

Jako referenční kmeny byly použity *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (*American Type Culture Collection*) a *Staphylococcus aureus* NCTC 8325 (*National Collection of Type Cultures*) z České národní sbírky typových kultur. Kontrolní kmeny použité při amplifikaci genů rezistence pomocí PCR jsou uvedeny v tabulce 8; pocházejí ze Sbírký Ústavu lékařské mikrobiologie FN Motol.

Tabulka 8: Kontrolní kmeny použité jako pozitivní kontroly při detekci genů rezistence. Kontrolní kmeny s genem *ermA*, *ermB*, *ermC* a *msrA* poskytl G. Lina (*Centre National de Référence des Toxémies à Staphylocoques, Lyon, Francie*). Kontrolní kmeny s geny rezistence k aminoglykosidům poskytl R. Vanhoof (*Pasteur Institute of Brabant, Brussel, Belgie*).

NÁZEV KONTROLNÍHO KMENE	KÓDOVANÝ GEN	REFERENCE
<i>S. aureus</i> HM1055	<i>ermA</i>	Lina et al. 1999
<i>S. aureus</i> CR580	<i>ermB</i>	Lina et al. 1999
<i>S. aureus</i> HM290-1	<i>ermC</i>	Lina et al. 1999
<i>S. aureus</i> RN4220	<i>msrA</i>	Lina et al. 1999
<i>S. aureus</i> 1812	<i>aacA-aphD</i>	Vanhoof et al. 1994
<i>S. aureus</i> 1808	<i>aphA3</i>	Vanhoof et al. 1994
<i>S. aureus</i> 476	<i>aadC</i>	Vanhoof et al. 1994
MRSA	<i>mecA</i>	klinický kmen, FN Motol

4.1.3. KULTIVAČNÍ MÉDIA

Columbia médium (*Columbia Blood Agar Base, Oxoid*)

Mueller-Hintonovo médium (*Mueller-Hinton Agar, Oxoid*)

Schaedlerovo médium (*Schaedler Anaerobe Agar, Oxoid*)

BHI médium (*Brain Heart Infusion Agar, Oxoid*)

- 47 g BHI agaru v 1 l destilované vody povařeno až do úplného rozpuštění, autoklávováno 20 minut při 121 °C, sterilně rozplněno do Petriho misek po 21 ml
- BHI médium s antibiotikem: médium připraveno podle návodu výrobce (viz výše), po vychladnutí média na přibližně 50-60 °C přidáno stanovené množství zásobního roztoku antibiotika (v kapitole 4.1.8., tab. 16) a sterilně rozplněno do Petriho misek po 21 ml.

4.1.4. CHEMIKÁLIE A ROZTOKY

CHEMIKÁLIE A ROZTOKY PRO HORIZONTÁLNÍ A PULZNÍ ELEKTROFORÉZU

TBE pufr 50%

- Tris 45 mM (Tris(hydroxymetyl)aminometan), kyselina boritá 45 mM, EDTA 1 mM (etylendiaminotetraoctová kyselina), vše rozpuštěno v destilované vodě

Tris pufr (1M, pH 8,0)

- 121,1 g Tris, 800 ml destilované vody, změřeno pH, upraveno 1M HCl (4,31 g konc. HCl v 50 ml destilované vody) na pH 8,0. Doplněno do 1 l destilovanou vodou, autoklávováno 20 minut při 121 °C.

EDTA pufr (0,5M, pH 8,0)

- 18,61 g EDTA, 80 ml destilované vody, upraveno 2M NaOH (4 g NaOH v 50 ml destilované vody) na pH 8,0 (EDTA se při nižším pH než 8 nerozpouští), doplněno do 100 ml destilovanou vodou, autoklávováno 20 minut při 121 °C.

PIV roztok

- 5 ml 1M Tris (pH 8,0), 29,2 g NaCl, doplněno destilovanou vodou do 500 ml, autoklávováno 20 minut při 121 °C.

EC roztok

- 3 ml 1M Tris (pH 8,0), 29,2 g NaCl, 100 ml 0,5M EDTA (pH 8,0), 1 g Na-deoxycholátu, 2,5 g Na-Lauroyl-Sarcosinu, doplněno destilovanou vodou do 500 ml a autoklávováno 20 minut při 121 °C.

ES roztok

- 2 g Na-Lauroyl-Sarcosinu, 150 ml 0,5M EDTA pufru (upraveno na pH 9,0), mícháno na magnetické míchačce do úplného rozpuštění. Doplněno do 200 ml destilovanou vodou a autoklávováno 20 minut při 121 °C.

ESP roztok

- na 1 kmen: 1 ml ES roztoku + 1 mg proteinázy K

TE roztok

- 10 ml 1M Tris (pH 8), 2 ml 0,5M EDTA (pH 8), doplněno destilovanou vodou do 1 l a autoklávováno 20 minut při 121 °C.

Etidium bromid (Sigma Aldrich, připraven zásobní roztok 10mg/ml)

Agaróza (SERVA)

Agaróza na PFGE (*Pulsed Field Certified Agarose*, Bio-Rad)

Agaróza nízkotající (*Certified Low Melt Agarose*, Bio-Rad)

Příprava 1% agarózového gelu na horizontální elektroforézu

- 0,3 g agarózy, 30 ml TBE pufru 50%, 1 ul etidium bromidu. Pufr s agarózou přivedeny k varu, po úplném rozpuštění agarózy přidán etidium bromid.

Příprava gelu na pulzní elektroforézu

- 1 g agarózy na PFGE, 100 ml TBE pufru 50%. Pufr s agarózou přivedeny k varu, etidium bromid se přidává až po skončení elektroforézy.

Příprava nízkotající agarózy pro tvorbu disků na PFGE

- 0,075 g nízkotající agarózy, 5 ml PIV. PIV roztok s agarózou přivedeny k varu a udržovány při teplotě 42° až do použití.

CHEMIKÁLIE PRO PCR

- Sterilní destilovaná voda (*RNase-free Distilled Water*, Takara Bio)
- *Combi PPP Master Mix* (Top-Bio) – pro „hot start“ PCR
- *EmeraldAmp MAX PCR Master Mix* (Takara Bio) – pro produkty dlouhé až 15 kb, pro sekvenaci

CHEMIKÁLIE PRO TESTOVÁNÍ AUXOTROFIE

Tabulka 9: Chemikálie pro testování auxotrofie buď ve formě disku (hemin) nebo pro přípravu roztoku, jímž byl disk napuštěn (tymidin, menadion).

AUXOTROFNÍ POŽADAVEK	VÝROBCE	KONCENTRACE ZÁSOBNÍHO ROZTOKU	OBJEM V DISKU
Tymidin	Sigma Aldrich	63µl/ml	5 µl na sterilní disk
Menadion	Sigma Aldrich	1,5 µl/10µl	10 µl na sterilní disk
Hemin (Faktor X)	ITest Plus	-	disk dodaný výrobcem

4.1.5. ENZYMY

- Restriktáza *Sma*I (Fermentas)
- Tango pufr (Fermentas)
- Lyzozym (Merck)
- Lyzostafin (Sigma)
- Proteináza K (Roche)

4.1.6. PRIMERY PRO PCR

Primery pro PCR byly převzaty z uvedené literatury a jsou seřazeny v níže uvedených tabulkách 10-13 podle typu amplifikovaných produktů. Lyofilizované primery (KRD) byly rozpuštěny ve sterilní vodě a uschovány jako pracovní roztok přímého i zpětného primeru (koncentrace 5 pmol) při -20 °C.

Tabulka 10: Primery pro amplifikaci polymorfního regionu genu *spa* a dále genů *mutS* a *mutL*. Vzhledem k velikosti genu *mutS* byla amplifikace provedena po pěti vzájemně se překrývajících úsecích. Stejně tak u genu *mutL* byla amplifikace provedena po kratších, vzájemně se překrývajících úsecích (amplifikovány pouze 2 z 5 úseků).

NÁZEV PRODUKTU	NÁZEV PRIMERU	SEKVENCE PRIMERU	TEPLOTA TÁNÍ [°C]	TEPLOTA NASEDÁNÍ [°C]	REFERENCE
<i>spa</i>	<i>spa-1113f</i>	TAAAGACGATCCTTCGGTGAGC	56,6	60	Harmsen <i>et al.</i> 2003
	<i>spa-1514r</i>	CAGCAGTAGTGCCGTTTGCTT	58,3		
<i>mutS 1</i>	<i>mutS U1</i>	AATAATTAATAATTA AAAAGC	37,7	45	Prunier <i>et al.</i> 2003
	<i>mutS L1</i>	CAGGTTGATTCATAACAAAAC	47,7		
<i>mutS 2</i>	<i>mutS U2</i>	AACTGTGATGGAGCAAGGTGG	57,6	55	Prunier <i>et al.</i> 2003
	<i>mutS L2</i>	GTGCTTCAATTTGTTCTTTAC	48,1		
<i>mutS 3</i>	<i>mutS U3</i>	ACACCAATGGGAGCACGCCGC	65,5	60	Prunier <i>et al.</i> 2003
	<i>mutS L3</i>	TTCAAAATTTTGCAAGTTGGC	51,0		
<i>mutS 4</i>	<i>mutS U4</i>	AAGCTTAATAAAGTGTTTGG	46,9	50	Prunier <i>et al.</i> 2003
	<i>mutS L4</i>	TCAAATATAGGTAACACTGCC	49,7		
<i>mutS 5</i>	<i>mutS U5</i>	GTTGCCATAATTAGTATAATG	44,2	50	Prunier <i>et al.</i> 2003
	<i>mutS L5</i>	TTATTTGCTAATGAGGTTTGG	48,6		
<i>mutL 1</i>	<i>mutL U1</i>	TAATATGACACCAATTGAGGC	50,3	55	Prunier a Leclerq 2005
	<i>mutL L1</i>	CCTTTTTTCGCTTTTGCAAGC	56,1		
<i>mutL 2</i>	<i>mutL U2</i>	TTGCACGGATAATGCTAATGG	53,3	55	Prunier a Leclerq 2005
	<i>mutL L2</i>	ATAACAAATCGGGAACCTACC	52,2		

Tabulka 11: Primery pro amplifikaci genů rezistence k MLS_B antibiotikům s rozdělením podle typu kódovaného produktu. K detekci genu *ermC* jsme použili nejprve primery *ermC1* a *ermC2*, ale z důvodu špatné efektivity amplifikace byly kmeny s předpokládaným a neprokázaným genem *ermC* testovány také s novými primery *ermC-F* a *ermC-R*.

NÁZEV PRODUKTU	NÁZEV PRIMERU	SEKVENCE PRIMERU	TEPLOTA TÁNÍ [°C]	TEPLOTA NASEDÁNÍ [°C]	REFERENCE	
M E T Y L A Z Y	<i>ermA</i>	<i>ermA1</i>	GTTCAAGAACAATCAATACAGAG	49,7	58	Lina <i>et al.</i> 1999
		<i>ermA2</i>	GGATCAGGAAAAGGACATTTTAC	51,8		
	<i>ermB</i>	<i>ermB1</i>	CCGTTTACGAAATTGGAACAGGTAAAGGGC	61,3	55	Lina <i>et al.</i> 1999
		<i>ermB2</i>	GAATCGAGACTTGAGTGTGC	53,4		
	<i>ermC-I</i>	<i>ermC1</i>	GCTAATATTGTTTAAATCGTCAATTCC	51,5	52	Lina <i>et al.</i> 1999
		<i>ermC2</i>	GGATCAGGACATTTTAC	44,0		
	<i>ermC-II</i>	<i>ermC-F</i>	TCAAAACATAATATAGATAAA	39,5	48	Chung <i>et al.</i> 1999
		<i>ermC-R</i>	GCTAATATTGTTTAAATCGTCAAT	48,0		
	<i>ermF</i>	<i>ermF1</i>	CGGGTCAGCACTTTACTATTG	53,4	50	Chung <i>et al.</i> 1999
		<i>ermF2</i>	GGACCTACCTCATAGACAAG	51,4		
	<i>ermG</i>	<i>ermG1</i>	CATTTCTAGCCACAATCCAT	52,8	50	Wang <i>et al.</i> 2005
		<i>ermG2</i>	TTAAATAGCGATACAAATTGTTTCG	49,9		
	<i>ermQ</i>	<i>ermQ1</i>	AAGTTATTGGGTTACAGCTA	48,4	50	Popowska <i>et al.</i> 2012
		<i>ermQ2</i>	CACCTCCTAATTTAAATCTACTA	47,2		
	<i>ermT</i>	<i>ermT1</i>	CATATAAATGAAATTTTGAG	52,8	50	Chen <i>et al.</i> 2007
		<i>ermT2</i>	ACGATTTGTATTTAGCAACC	49,9		
<i>erm43</i>	<i>erm43-F</i>	TACAGCAGATGATAACATTG	47,4	50	Schwendener a Perreten 2012	
	<i>erm43-R</i>	TGTTGTTTCGATATTTTATTTAAG	46,0			
EFLUXNÍ PUMPY	<i>msrA</i>	<i>msrA1</i>	GGCACAATAAGAGTGTTTAAAGG	52,2	58	Lina <i>et al.</i> 1999
		<i>msrA2</i>	AAGTTATATCATGAATAGATTGCCTGTT	52,8		
	<i>mefA</i>	<i>mefA1</i>	AGTATCATAATCACTAGTGC	47,1	50	Sutcliffe <i>et al.</i> 1996
		<i>mefA2</i>	TTCTTCTGGTACTAAAAGTGG	49,6		
	<i>msrD</i>	<i>msrD1</i>	TGCCTATATCCCCAGTTG	51,6	50	Amezaga a McKenzie 2006
<i>msrD2</i>		TTAATTTCCGCACCGACTA	51,3			
MODIFIKAČNÍ ENZYMY	<i>ereA</i>	<i>ereA1</i>	AACACCCTGAACCCAAGGGACG	61,7	53	Sutcliffe <i>et al.</i> 1996
		<i>ereA2</i>	CTTCACATCCGGATTGCTCGA	59,1		
	<i>ereB</i>	<i>ereB1</i>	CACCTAATGCTACAACCTCGGG	55,3	53	Rachek <i>et al.</i> 2000
		<i>ereB2</i>	GGAGATACCCGAGTTGTAGC	54,5		
	<i>mphC</i>	<i>mphC-F</i>	ATGACTCGACATAATGAAAT	46,6	45	Schnellmann <i>et al.</i> 2006
		<i>mphC-R</i>	CTACTCTTTCATACCTAACTC	47,0		

Tabulka 12: Primery pro amplifikaci genů rezistence ke gentamicinu a oxacilinu

NÁZEV PRODUKTU	NÁZEV PRIMERU	SEKVENCE PRIMERU	TEPLOTA TÁNÍ [°C]	TEPLOTA NASEDÁNÍ [°C]	REFERENCE
<i>aacA-aphD</i>	1. <i>aacA-aphD</i>	CCAAGAGCAATAAGGGCATAACC	55,8	55	Vanhoof <i>et al.</i> 1994
	2. <i>aacA-aphD</i>	CACACTATCATAACCACTACCG	52,6		
<i>aphA3</i>	3. <i>aphA3</i>	CTGATCGAAAAATACCGCTGC	54,4	55	Vanhoof <i>et al.</i> 1994
	4. <i>aphA4</i>	TCATACTCTCCGAGCAAAGG	54,3		
<i>aadC</i>	5. <i>aadC</i>	CTGCTAAATCGGTAGAAGC	50,5	55	Vanhoof <i>et al.</i> 1994
	6. <i>aadC</i>	CAGACCAATCAACATGGCACC	56,6		
<i>mecA</i>	RSM2647	AAAATCGATGGTAAAGGTTGGC	53,8	55	Vanhoof <i>et al.</i> 1994
	RSM2648	AGTTCTGCAGTACCGGATTTC	57,6		

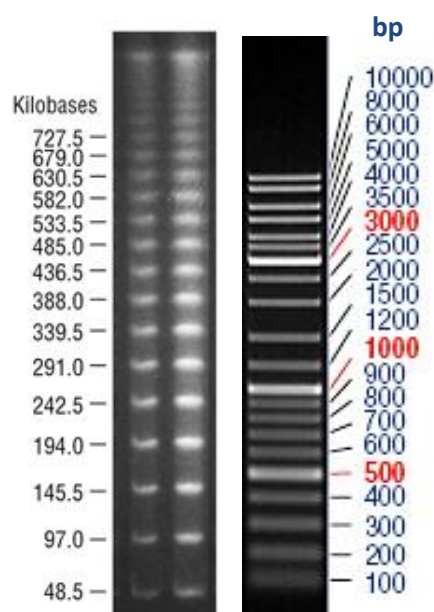
Tabulka 13: Primery pro amplifikaci genů kódujících vybrané komponenty ribozomu.

NÁZEV PRODUKTU	NÁZEV PRIMERU	SEKVENCE PRIMERU	TEPLOTA TÁNÍ [°C]	TEPLOTA NASEDÁNÍ [°C]	REFERENCE
<i>rrl domain V</i>	P3 (23S V)	CTGTCTCAACGAGAGACTCGG	56,7	57	Besier <i>et al.</i> 2008
	P4 (23S V)	CGCTCACGTTTCAAAGGCTCC	59		
<i>rrl domain II</i>	<i>rrlIII-F</i>	CGGAAGGGGAGTGAAATAGAAC	55,1	57	Malburny <i>et al.</i> 2002
	<i>rrlIII-R</i>	ACTAACCCAGAGCGGACGAGC	61,3		
<i>rplV (L22)</i>	<i>rplV-F</i>	CAAAGGACACGTTGCAGACGACAAGAAA	61,2	60	Prunier <i>et al.</i> 2002
	<i>rplV-R</i>	ATTTTTTGACCACAGTATTCCTCCTT	58,5		
<i>rplD (L4)</i>	<i>rplD-F</i>	AATAATAAGAAGTGAAAGGAGG	47,7	48	Malburny <i>et al.</i> 2002
	<i>rplD-R</i>	GCCATTTTACTTGTGTTTTG	48,9		

4.1.7. STANDARDY DNA

- *O'GeneRuler DNA Ladder Mix*
(Thermo Scientific)
- *Lambda Ladder PFG Marker*
(New England BioLabs)

Obr. 13: Standardy DNA. Vlevo Lambda marker rozdělený pulzní elektroforézou (parametry 1% agarózový gel, 4,5 V/cm, 15°C, trvání 48 hodin, intervaly pulzů 5-120 sekund). Vpravo DNA marker pro PCR rozdělený standardní elektroforézou.



4.1.8. ANTIBIOTIKA

Stanovovali jsme citlivost k 6 vybraným, klinicky významným antibiotikům: erytromycinu (zástupce makrolidů), klindamycinu (zástupce linkosamidů), kotrimoxazolu, oxacilinu, cefoxitinu a gentamicinu. Citlivost na streptogramin B jsme netestovali, protože klinicky se používá pouze omezeně. Rezistence ke kotrimoxazolu je typická pro auxotrofní kmeny SCV *S. aureus*, rezistence k oxacilinu a cefoxitinu zase pro kmeny MRSA. Gentamicin je zástupcem aminoglykosidů.

DISKY OBSAHUJÍCÍ PŘEDEPSANOU KONCENTRACI ANTIBIOTIKA

Tabulka 14: Antibiotické disky použité při diskovém difuzním testu (Antimicrobial Susceptibility Test Discs, Oxoid) včetně hraničního průměru zóny pro *S. aureus* ke stanovení citlivosti nebo rezistence testovaného bakteriálního kmene – na základě doporučení SZÚ (Urbášková et al. 2010 podle EUCAST, Evropské komise pro testování antimikrobiální citlivosti). Hodnoty pro oxacilin, které EUCAST neuvádí, převzaty z návodu výrobce disků. Hodnoty mezi hranicí citlivosti a hranicí rezistence jsou považovány za intermediární rezistenci.

NÁZEV ANTIBIOTIKA	ZKRATKA	KONCENTRACE ANTIBIOTIKA V DISKU (µg)	CITLIVOST: PRŮMĚR ZÓNY (cm)	REZISTENCE: PRŮMĚR ZÓNY (cm)
Klindamycin	DA	2	≥22	<19
Erytromycin	E	15	≥21	<18
Kotrimoxazol	SXT	25	≥17	<14
Oxacilin	OX	1	≥13	<13
Gentamicin	CN	10	≥18	<18
Cefoxitin	FOX	30	≥22	<22

ĚTESTY - PLASTIKOVÉ PROUŽKY OBSAHUJÍCÍ GRADIENT KONCENTRACE ANTIBIOTIKA

Tabulka 15: Etesty s gradientem koncentrace příslušného antibiotika použité pro stanovení MIC (M.I.C.Evaluator, Oxoid) tohoto antibiotika pro *S. aureus*. Hraniční hodnoty pro citlivost nebo rezistenci převzaty na základě doporučení SZÚ (Urbášková et al. 2010 podle EUCAST).

ANTIBIOTIKUM V ETESTU	ZKRATKA	ROZMEZÍ GRADIENTU (µg/ml)	CITLIVÝ (µg/ml)	REZISTENTNÍ (µg/ml)
Erytromycin	E	0,015-256	≤1	>2
Klindamycin	DA	0,015-256	≤0,25	>0,5
Gentamicin	CN	0,06-1024	≤1	>1
Oxacilin	OX	0,015-256	≤2	>2

ANTIBIOTIKA K PŘÍPRAVĚ MÉDIA PRO TESTOVÁNÍ HYPERMUTABILITY

Po rozpuštění antibiotika v příslušném rozpouštědle byl vzniklý roztok pročištěn přes sterilní stříkačkový polyesterový filtr o průměru 0,22 µm (Techno Plastic Products, Bio-Tech). Zásobní roztok byl uchováván při -20 °C, v případě rifampicinu a kanamycinu rovněž chráněn před světlem.

Tabulka 16: Antibiotika k testování hypermutability pro přípravu zásobního roztoku v uvedeném rozpouštědle. Následně byl připraven BHI agar s uvedeným množstvím tohoto roztoku antibiotika.

ANTIBIOTIKUM	ROZPOUŠTĚDLO	KONCENTRACE ZÁSOBNÍHO ROZTOKU (mg/ml)	KONCENTRACE V BHI MÉDIU (µg/ml MÉDIA)	VÝROBCE ANTIBIOTIKA
Rifampicin	EDTA	100	100	Duchefa
Streptomycin	dH ₂ O	300	300	Serva
Ciprofloxacin	0,1M HCl	25	50	Fluka
Kanamycin	dH ₂ O	50	50	Roth P-Lab

4.1.9. IZOLAČNÍ A DIAGNOSTICKÉ SOUPRAVY

- Latexový aglutinační test pro průkaz PBP2a u MRSA (*MRSA Latex Test*, Denka Seiken)
- AMPLICOR Respiratory Specimen Preparation Kit (Roche) – pro izolaci DNA *S. aureus*

4.1.10. SOFTWARE A INTERNETOVÉ DATABÁZE

- program Bionumerics (Applied Maths) – vyhodnocení PFGE
- program Ridom StaphType (Ridom GmbH) – spa typizace na základě sekvenace
- program BioEdit – prohlížení a editace sekvencí
- <http://www.spaserver.ridom.de/> (Ridom SpaServer)
- <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (Nucleotide Blast)

4.2. METODY

4.2.1. ODBĚR A MIKROSKOPICKÉ VYŠETŘENÍ SPUTA

Odběr ranního sputa byl proveden před vyšetřením samotným poučeným pacientem nebo přímo při vyšetření pod dohledem zdravotnického personálu. Odebrané sputum bylo nutné chladit a do 2-3 hodin transportovat do laboratoře. Tam jsme jej obarvili podle Grama a mikroskopicky jsme posoudili jeho kvalitu. Po vytřepání s mukolytikem jsme sputum kultivovali a následně jsme z něj izolovali fenotypově odlišné kolonie různých bakteriálních druhů, u nichž jsme dále prováděli identifikaci a stanovovali jsme jejich citlivost k vybraným antibiotikům.

4.2.2. KULTIVACE A UCHOVÁVÁNÍ IZOLÁTŮ *S. AUREUS*

Bakteriální kultury jsme uchovávali v zamrazovacím médiu při -80°C. Kultivace probíhala na krevním agaru přibližně 24 hodin při 37 °C. Poté jsme izolovali jednu až dvě kolonie typického vzhledu a následovala kultivace stejným způsobem, aby byla zajištěna práce s čistou kulturou. Každý izolát jsme identifikovali hmotnostní spektrometrií, otestovali jsme citlivost k antibiotikům, izolovali jeho DNA, popř. připravili disky pro PFGE. Poté byla kultura znovu zamrazena pro pozdější použití.

Uchovávání SCV izolátů je poměrně problematické, neboť tyto auxotrofní varianty mohou revertovat zpět k normálnímu fenotypu mateřského kmene. I v této studii jsme se setkali s případy, kdy sice izolát deklarovaný a zamražený jako SCV rostl po kultivaci normálně (NCV), nicméně často se podařilo opětovně zachytit SCV jako součást zamraženého mateřského izolátu.

4.2.3. HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE MALDI-TOF

Principem MALDI-TOF MS (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization – Time of Flight Mass Spectrometry*) je rozdělení nabitých částic v elektrickém poli na základě jejich molekulových hmotností. Na našem pracovišti je využíván přístroj Microflex LT System IVD Maldi Biotyper (Bruker Daltonik GmbH).

Na nerezovou destičku jsou nanášeny vzorky (vždy rozetřením biomasy z jedné kolonie) a poté je přes ně aplikována matrice, jejíž složení umožňuje uvolnění proteinů z buněk a jejich následnou fixaci tím, že na destičce vykrystalizují. Tím je také zajištěn přenos ionizační energie vakuem z laseru na vzorek. Částice (proteiny) jsou ionizovány silným elektrickým polem, přičemž se ve vakuu pohybují rychlostí odpovídající velikosti jejich náboje a hmotnosti. Z naměřené doby toku (*Time Of Flow, TOF*) těchto částic na detekční systém se pak vypočítá poměr molekulové hmotnosti

a náboje částic. Přítomné proteiny jsou softwarově vyhodnoceny v podobě spektra, které je porovnáno s databází a přiřazeno k určitému rodu a druhu s určitou pravděpodobností (hodnotou skóre). Podle dosaženého skóre se určuje spolehlivost identifikace:

$\geq 2,3$	<i>spolehlivá identifikace rodu i druhu</i>
2 – 2,29	<i>spolehlivá identifikace rodu, pravděpodobná identifikace druhu</i>
1,7 – 1,99	<i>pravděpodobná identifikace rodu</i>
$\leq 1,69$	<i>nesignifikantní skóre / nespolehlivá identifikace</i>

4.2.4. TESTOVÁNÍ AUXOTROFIE

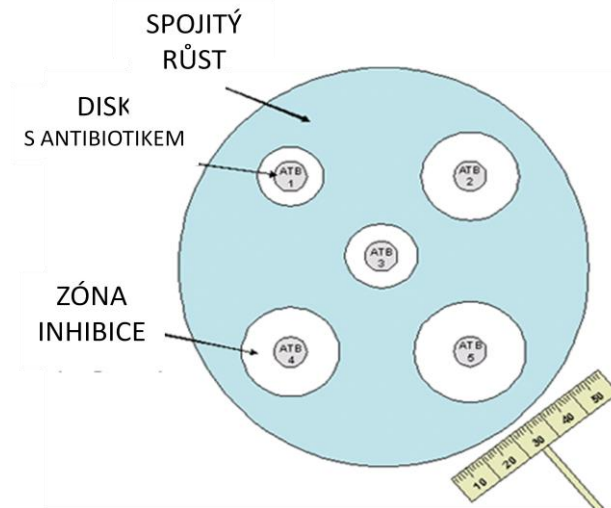
Po inkubaci kmenů přes noc při 37 °C bylo několik kolonií suspendováno do zkumavky s 3 ml fyziologického roztoku. Tato suspenze o zákalu přibližně 0,5 McFarland (odpovídá 150×10^6 CFU/ml) byla sterilním tamponem rozetřena v několika směrech po celé ploše agarové plotny (Mueller-Hinton agar), a to jednak na samotný MH agar a dále potom na MH agar s auxotrofním požadavkem, tj. s diskem napuštěným heminem, tymidinem nebo menadionem.

První plotna sloužila jako kontrola, zda kmen na MH agaru roste i bez přidané testované látky – pokud kmen na tomto chudém agaru nevyrostl nebo rostl pouze velmi málo, byl označen jako auxotrofní. Druhá plotna byla ukazatelem auxotrofního požadavku, pakliže kmen rostl pouze v kruhové výseči okolo disku s testovanou látkou, která do jeho okolí difundovala.

4.2.5. TESTOVÁNÍ CITLIVOSTI K ANTIBIOTIKŮM

DISKOVÝ DIFUZNÍ TEST

Po inkubaci kmenů přes noc při 37 °C bylo několik kolonií suspendováno do zkumavky s 3 ml fyziologického roztoku. Tato suspenze o zákalu přibližně 0,5 McFarland (odpovídá 150×10^6 CFU/ml) byla sterilním tamponem rozetřena v několika směrech po celé ploše agarové plotny (MH agar, případně Schaedler agar pro auxotrofní kmeny), na niž byly pak rovnoměrně po obvodu umístěny sterilní jehlou jednotlivé disky napuštěné vždy určitou koncentrací testovaného antibiotika, jež postupně difunduje do okolí disku. Pouze disky s erytromycinem a klindamycinem byly umístěny blíže k sobě, přibližně ve vzdálenosti 12-20 mm, aby bylo možné detekovat případnou inducibilní rezistenci ke klindamycinu – jde o tzv. D test (Urbášková *et al.* 2007, podle EUCAST, *D Zone Test*). Takto byly plotny inkubovány 24 hodin při 37 °C a následně byla měřena velikost inhibičních zón okolo jednotlivých disků (vyhodnocení podle tab. 14 v kapitole 4.1.8.).

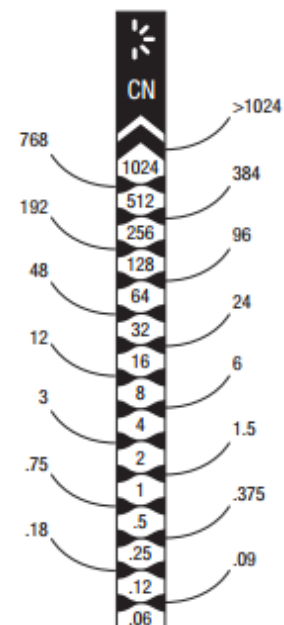


Obr. 14: Schéma výsledku diskového difuzního testu po 24 hodinové kultivaci při 37 °C. Upraveno podle www.cdc.gov.

STANOVENÍ MINIMÁLNÍ INHIBIČNÍ KONCENTRACE (MIC) ANTIBIOTIKA

Stejným způsobem se provádí měření minimální inhibiční koncentrace (MIC) antibiotika pro daný kmen, tj. nejnižší možná koncentrace této látky, při které je inhibován viditelný růst kultury po kultivaci přes noc. Na MH agar s rozetřenou bakteriální suspenzí se umístí plastický proužek obsahující gradient koncentrace antibiotika.

Obr. 15: Etest, plastický proužek s gradientem gentamicinu. Po stranách vyznačeny skutečné hodnoty MIC podle hranice zóny bakteriální kultury. Při odečtu pro klinické účely však odečítáme pouze přibližné hodnoty uvedené na stupnici natištěné na plastickém proužku (M.I.C.Evaluator, Oxoid).

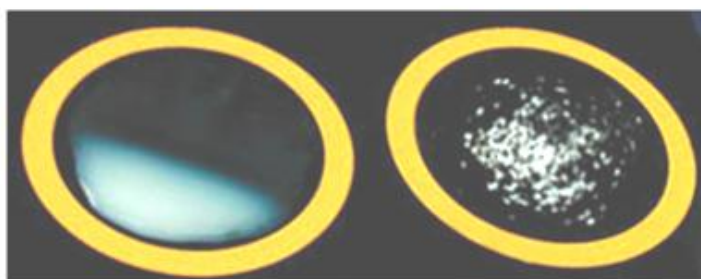


4.2.6. IZOLACE DNA

DNA byla izolována podle návodu výrobce izolační soupravy *AMPLICOR Respiratory Specimen Preparation Kit* (Roche). Uschována byla při 4 °C.

4.2.7. LATEXOVÝ AGLUTINAČNÍ TEST PRO PRŮKAZ PBP2A U MRSA

Latexový aglutinační test (Denka Seiken) byl proveden podle pokynů výrobce. Test využívá vysoce specifickou monoklonální protilátku k detekci PBP2a (PBP2'), alternativního proteinu vázícího penicilin, který zastupuje funkci PBP2 blokováného penicilinovými antibiotiky. PBP2a je tedy příčinou rezistence k penicilinům, a to včetně meticilinu či oxacilinu, a je tedy specifický pro kmeny MRSA. Na rozdíl od průkazu MRSA pouze na základě diskového difuzního testu je detekce genu rezistence (*mecA*) či v tomto případě jeho produktu (PBP2a) mnohem přesnější a spolehlivější, neboť fenotypový projev rezistence závisí na mnoha různých podmínkách kultivace.



Obr. 16: Latexový aglutinační test pro průkaz PBP2a u MRSA (Denka Seiken): Na detailním výřezu je patrný pozitivní test (vpravo) a negativní test (vlevo). Převzato z <https://catalog.hardydiagnostics.com/>

4.2.8. POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE (PCR)

Pomocí PCR se specifickými primery (uvedeny v kapitole 4.1.6.) byly amplifikovány geny rezistence k MLS_B antibiotikům, aminoglykosidům a meticilinu, geny pro vybrané ribozomální proteiny a vybrané domény 23S podjednotky rRNA, dále geny *mutS* a *mutL*, geny kódující toxiny a polymorfní region genu *spa*. Použité reagentie a jejich množství jsou uvedeny v tabulce 17.

Tabulka 17: Složení reakční směsi pro jednu PCR reakci podle účelu amplifikace: pro průkaz genů a pro sekvenaci amplifikovaných produktů. Reagentie byly přidávány k reakční směsi v pořadí uvedeném v tabulce. Primery byly přidány jako pracovní roztok přímého i zpětného primeru o celkové koncentraci 5pmol.

NÁZEV REAGENCIE	OBJEM NA 1 REAKCI (μl)	
	PRO PRŮKAZ GENŮ	PRO SEKVENACI
Master Mix	10,0 (<i>Combi PPP</i>)	12,5 (<i>Emerald Amp MAX PCR</i>)
Sterilní voda	7,5	10,0
Primery (pracovní roztok)	1,0	1,0
DNA	1,5	1,5
Celkový objem	20,0	25,0

PCR reakce byla provedena v termocykleru *Gene Pro* (Bioer) podle schématu uvedeného v tab. 18. Po skončení PCR byla úspěšnost amplifikace ověřena horizontální gelovou elektroforézou.

Tabulka 18: Jednotlivé fáze polymerázové řetězové reakce. Fáze 2-4 (v oranžovém rámečku) byly opakovány 30x a jejich trvání bylo prodlouženo u vzorků amplifikovaných pro sekvenční účely. Teplota nasedání primerů (T_A – Annealing Temperature) není uvedena, neboť se lišila podle použitých primerů (v kapitole 4.1.6.).

FÁZE PCR REAKCE	TEPLOTA [°C]	DOBA TRVÁNÍ FÁZE	
		PRO PRŮKAZ GENŮ	PRO SEKVENACI
1. Denaturace DNA	94	10 min	10 min
2. Denaturace DNA	94	30 s	45 s
3. Nasedání primerů	Variabilní T_A	30 s	45 s
4. Elongace	72	30 s	90 s
5. Závěrečné dosyntetizování	72	10 min	10 min
6. Chlazení po skončení PCR	10	–	–

30x

4.2.9. HORIZONTÁLNÍ GELOVÁ ELEKTROFORÉZA

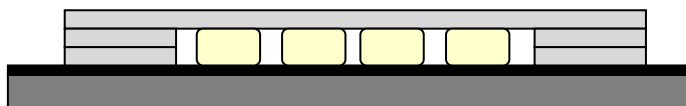
Horizontální gelová elektroforéza byla použita k vizualizaci amplifikovaných produktů a jejich rozdělení podle velikosti. Agarózový 1% gel byl obarven etidium bromidem. Parametry pro elektroforézu vzorků byly vždy 80 V, 150 W a 500 mA (*Electrophoresis Power Supply E835*, Consort). Jako DNA standard byl použit *O'GeneRuler DNA Ladder Mix* (Thermo Scientific).

4.2.10. PULZNÍ GELOVÁ ELEKTROFORÉZA

Pulzní gelová elektroforéza slouží k typizaci na základě makrorestrikčního profilu DNA získaného štěpením vybranou restriční endonukleázou, v našem případě *SmaI* (Chung *et al.* 2000). Tímto enzymem byla DNA rozštěpena na 15-20 fragmentů, jejichž délka 10-700 kb (Tenover *et al.* 1995) neumožňuje rozdělení pomocí standardní horizontální elektroforézy. Proto je nutné použít elektroforézu ve speciálním uspořádání, kdy je v opakujících se pulzech neustále měněn směr proudu, což umožňuje postupné rozdělení fragmentů podle velikosti. Aby při manipulaci nedošlo k poškození dlouhých fragmentů, pracuje se s bakteriálními buňkami (a později z nich izolovanou DNA) výhradně v podobě agarózových disků.

PŘÍPRAVA AGARÓZOVÝCH DISKŮ

1. Biomasa z bakteriální kultury (kultivace přes noc, v případě SCV 24 hodin) byla několikrát resuspendována v PIV roztoku, který byl po centrifugaci slit.
2. Poté byla na základě měření optické denzity (*ELISA Reader*) suspenze naředěna PIV roztokem na požadovanou optickou denzitu 0,50 - 0,150.
3. Suspenze o definované optické denzitě byla inkubována 10 minut při teplotě 42°C a poté důkladně smíchána s 1,5% nízkotající agarózou v poměru 1:1.
4. Tato směs bakteriálního inokula a agarózy byla následně pipetou nanášena na sklo (potažené parafilmem) v podobě kapek o definovaném objemu 20 µl. Kapky daného vzorku byly poté překryty podložním sklem podepřeným dalšími podložními skly (podle obr. 17) a takto umístěny přibližně na 30 minut do lednice. Výsledkem byly gelovité disky obsahující celé bakteriální buňky.



Obr. 17: Příprava disků s bakteriální biomasou pro PFGE. Skleněná deska (tmavě šedě) překrytá parafilmem (černě) s nanesenými kapkami směsi bakteriální suspenze s agarózou, které byly překryty speciálně uspořádanými podložními skly (světle šedě). Po ztuhnutí vznikly gelovité disky (vyznačeny žlutě).

LÝZA DNA V AGARÓZOVÝCH DISCÍCH

1. Jeden agarózový disk byl umístěn do zkumavky s 1 ml EC lyzujícího roztoku, takto byly zkumavky inkubovány 5 hodin při 37 °C ve vodní lázni.
2. Po slití EC lyzujícího roztoku přes gázu byl k disku s lyzovanými bakteriemi přidán 1 ml ESP roztoku (proteináza K), takto inkubováno přes noc při 50 °C ve vodní lázni.
3. Po slití ESP roztoku se disky, obsahující nyní extrahovanou volnou celogenomovou DNA, promývaly několikrát TE roztokem. Po posledním promytí byly disky ve zkumavce s TE roztokem uloženy do lednice k pozdějšímu použití.

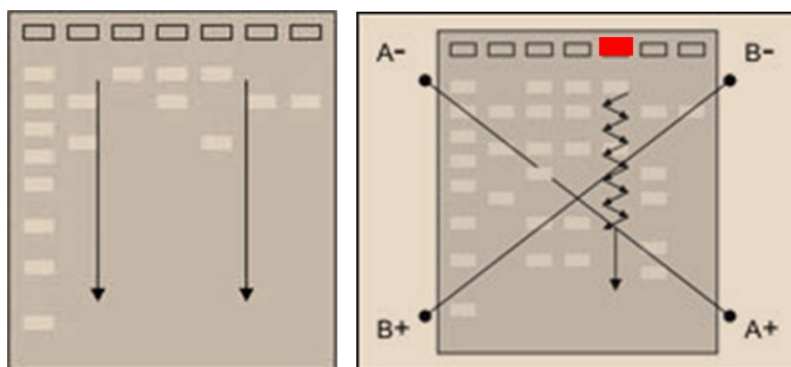
ŠTĚPENÍ AGARÓZOVÝCH DISKŮ RESTRIKTÁZOU SmaI

Disk byl umístěn do mikrozkušavky se 40 µl restriktční směsi: 4 µl 10x Tango pufru, 2 µl SmaI (Fermentas; 10U/µl, tj. 20U na disk) a 34 µl sterilní vody. Takto inkubováno 5 hodin při 30 °C ve vodní lázni.

PULZNÍ ELEKTROFORÉZA AGARÓZOVÝCH DISKŮ

1. 100 ml 1% roztoku agaru pro PFGE bylo nalito do speciální formy na gel.
2. Vana pro PFGE byla naplněna TBE roztokem, který bylo nutné vychladit na 14 °C. Do jamek v gelu byly postupně za pomoci kličky kladeny jednotlivé disky obsahující velké fragmenty naštěpené DNA, a to tak, aby disk vždy přilehl k přední stěně jamky. Vložen byl také disk typového kmene a v pravidelných rozestupech rovněž tenké disky PFGE markeru (*Lambda Ladder PFG Marker*, New England BioLabs).
3. Posléze byly disky v jamkách zality roztaveným 1% roztokem agarózy pro PFGE.

Gel byl vložen do vany s vychlazeným TBE pufrům. Parametry pulzní elektroforézy: 20 hodin, intervaly pulzů 5-35s, 6V/cm, 120°. Po celou dobu bylo nutné udržovat teplotu 14 °C (za pomoci pumpy a chladiče). Veškeré vybavení pro PFGE (vana, pumpa, chladič, pohonný a řídicí modul typu CHEFIII) vyrobila firma Bio-rad.



Obr. 18: Schematické porovnání uspořádání horizontální elektroforézy (vlevo) a pulzní elektroforézy (vpravo). Při pulzní elektroforéze prochází elektrický proud po několikasekundových intervalech střídavě mezi elektrodami A a elektrodami B, což umožňuje postupné rozdělení delších fragmentů (naznačeno šipkami u vzorku označeného červeně). Upraveno podle <http://www.genomebc.ca/education/articles/food-forensics/>.

VYHODNOCENÍ VÝSLEDKŮ PFGE

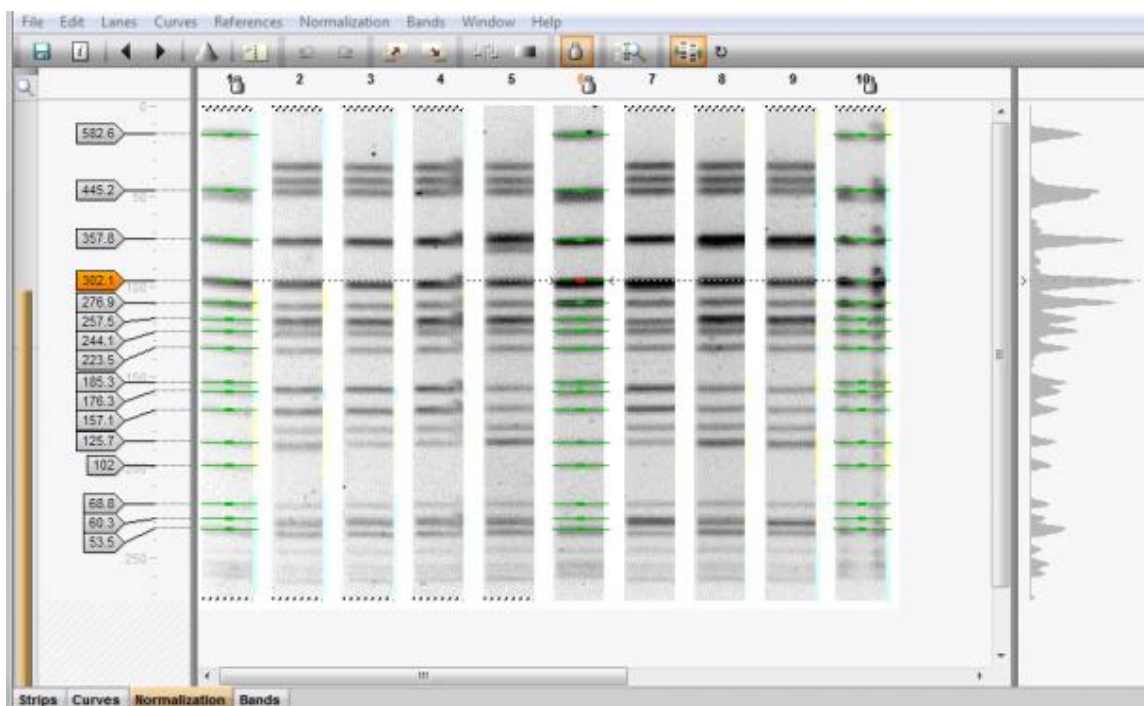
Po dokončení elektroforézy byl gel 30 minut barven v TBE pufru s přidaným etidium-bromidem, následně 30 minut odbarvován v destilované vodě a vizualizován pod UV světlem.

Vyhodnocení restričních profilů bylo provedeno v programu Bionumerics (Applied Maths) podle návodu výrobce, jak ukazuje obr. 19. V restričních profilech může docházet k různým změnám, od bodových mutací vedoucích ke ztrátě nebo vzniku nového restričního místa, až po inserce DNA do existujícího fragmentu DNA nebo naopak delece. Na základě změny počtu

fragmentů (proužků) v restrikčních profilech lze potom určit, zda jsou izoláty příbuzné či nikoli (tabulka 19).

Tabulka 19: Kritéria vyhodnocování výsledků makrorestrikční analýzy podle Tenover et al. 1995.

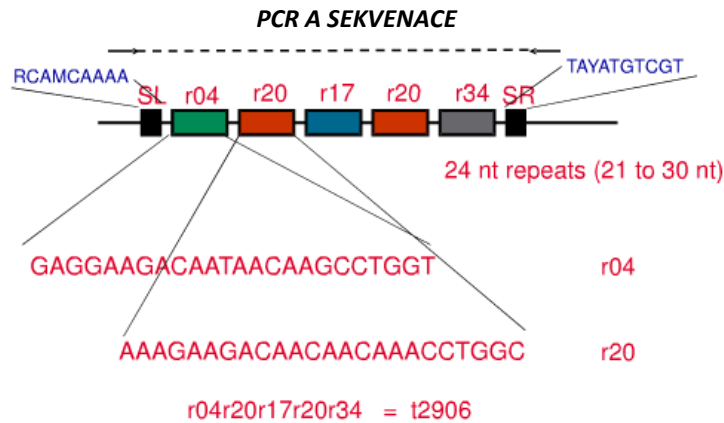
PODOBNOT RESTRIKČNÍCH PROFILŮ DVOU IZOLÁTŮ	INTERPRETACE
žádný rozdíl	izoláty jsou totožné
rozdíl 1-3 fragmenty	izoláty jsou blíže příbuzné
rozdíl 4-6 fragmentů	izoláty mohou být příbuzné
rozdíl více než 6 fragmentů	izoláty nejsou příbuzné



Obr. 19: Ukázka vyhodnocení restrikčních profilů testovaných izolátů po rozdělení fragmentů pulzní elektroforézou. Software Bionumerics umožňuje optimalizaci každé fotografie gelu a normalizaci jednotlivých profilů podle profilu PFGE markeru (vlevo, vpravo a uprostřed, se zeleně vyznačenými fragmenty).

4.2.11. JEDNOLOKUSOVÁ SEKVENAČNÍ TYPIZACE – SPA TYPIZACE

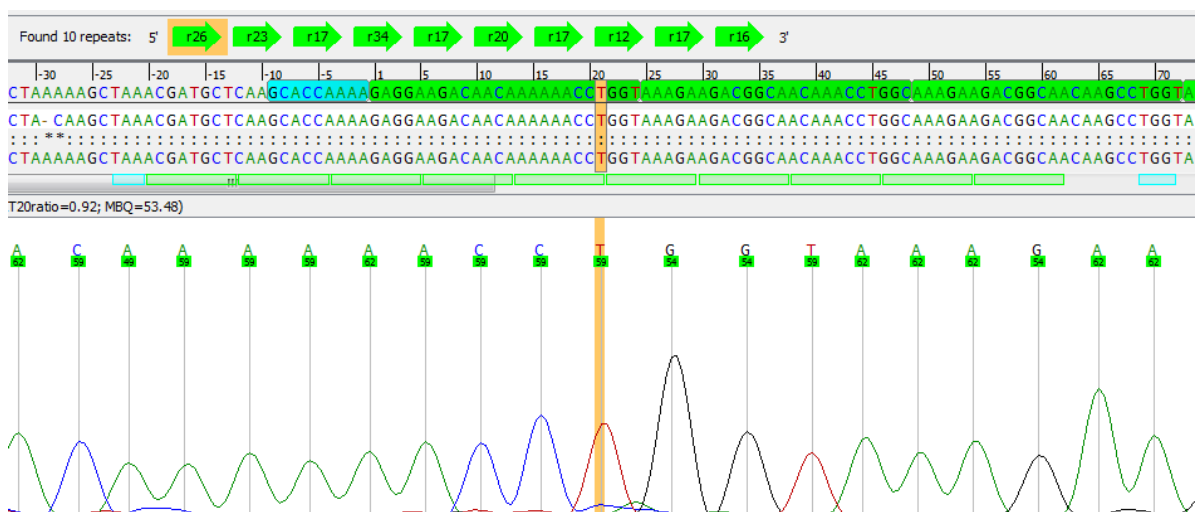
Spa typizace je příkladem sekvenační metody, kdy jsou vzorky rozděleny podle sekvenční podobnosti v jednom konkrétním lokusu. Gen *spa*, unikátní pro stafylokoky, kóduje povrchový protein A. Polymorfni region X genu *spa* je charakteristický výskytem krátkých repetice o délce nejčastěji 24 bp, rozmanitých co do sekvence, počtu i pořadí.



Obr. 20: Polymorfní region X genu spa, jehož strukturu tvoří repetice s variabilní sekvencí, většinou však s neměnnou délkou 24 nukleotidů (případně 21 / 27 / 30 nukleotidů). Informace o sekvenci jednotlivých repetic a jejich pořadí je pak převedena do číselného kódu, na základě kterého je izolátu přidělen určitý spa typ. Na schématu zobrazen tento postup pro izolát se spa typem t2906, u kterého je pořadí repetic r04-r20-r17-r20-r34.

Tato oblast genu *spa* byla amplifikována a posléze sekvenována. Podle sekvence přítomných repetic a jejich pořadí v tomto lokusu se pak určuje tzv. spa typ příslušného vzorku, a to na základě srovnání s volně přístupnou databází všech známých spa typů (přičemž neustále jsou po celém světě detekovány dosud nepopsané spa typy i repetice). Spa typy pak lze podle příbuznosti uspořádat do vyšších jednotek, tzv. spa klonálních komplexů (spa-CC), a to podle počtu změn v polymorfním regionu genu *spa*.

Získané sekvence regionu X našich vzorků byly počítačově vyhodnoceny softwarem Ridom StaphType, který automaticky přidělil každému vzorku číselný kód (podle pořadí a druhů repetic) a na základě srovnání s internetovou databází Ridom SpaServer (www.spaserver.ridom.de) přiřadil každému vzorku příslušný spa typ.



Obr. 21: Vyhodnocení sekvence regionu X genu spa programem Ridom StaphType: detekce repetice, v tomto případě v pořadí r26-r23-r17-r34-r17-r20-r17-r12-r17-r16 s přiřazeným spa typem t002.

4.2.12. TESTOVÁNÍ HYPERMUTABILITY OTISKOVOU METODOU

K testování hypermutability byla použita tzv. otisková metoda („*Replica Plating*“), která využívá přenesení narostlé bakteriální kultury otiskem na novou agarovou misku.

Od každého pacienta byly vybrány 1-2 izoláty (většinou časný izolát), které byly kultivovány přes noc při 37 °C nejprve na MH agaru a poté bylo několik kolonií z každého izolátu rozetřeno sterilní kličkou po ploše části (1/6 či 1/8) misky s BHI agarem, a to v několika směrech. Po 24 hodinové kultivaci při stejných podmínkách byly narostlé vzorky raznicí se sametovou látkou přeneseny otiskem na dvě nové misky s BHI agarem, které však navíc obsahovaly antibiotikum (rifampicin, kanamycin,



Obr. 22: Raznice pokrytá sterilní sametovou látkou s otištěnou narostlou bakteriální kulturou (8 vzorků z jedné BHI misky), která byla následně položena a lehce přitlačena na povrch nové BHI misky s přidavkem antibiotika.

streptomycin nebo ciprofloxacin), jež mělo selektovat pouze bakterie rezistentní k danému antibiotiku, tj. potenciální hypermutátory. Po dalších 24 hodinách kultivace při 37 °C byl spočítán počet narostlých kolonií příslušného kmene, a to na obou miskách s antibiotikem, na základě čehož jsme vzorky rozdělili do čtyř kategorií: kmeny bez hypermutability (0-1 kolonie), „velmi slabí hypermutátoři“ (2-5 kolonií), „slabí hypermutátoři“ (6-20 kolonií) a „silní hypermutátoři“ (více než 20 kolonií). Hraniční hodnoty pro toto orientační rozdělení do skupin jsme si zvolili sami. Pro kontrolu byl na každé misce umístěn vždy referenční silně hypermutátorový kmen z našeho souboru (50/1).

Cílem bylo optimalizovat otiskovou metodu, především vybrat vhodná antibiotika pro testování mutability, a to ve vhodné koncentraci, a dále selektovat z rozsáhlého souboru vzorků pouze potenciální hypermutabilní kmeny. U takto detekovaných potenciálních silných hypermutátorů pak byl amplifikován jejich gen *mutS* a část genu *mutL*, jejichž mutace by mohly být zodpovědné za hypermutabilitu.

5. VÝSLEDKY

5.1. VZHLED KOLONIÍ *S. AUREUS*

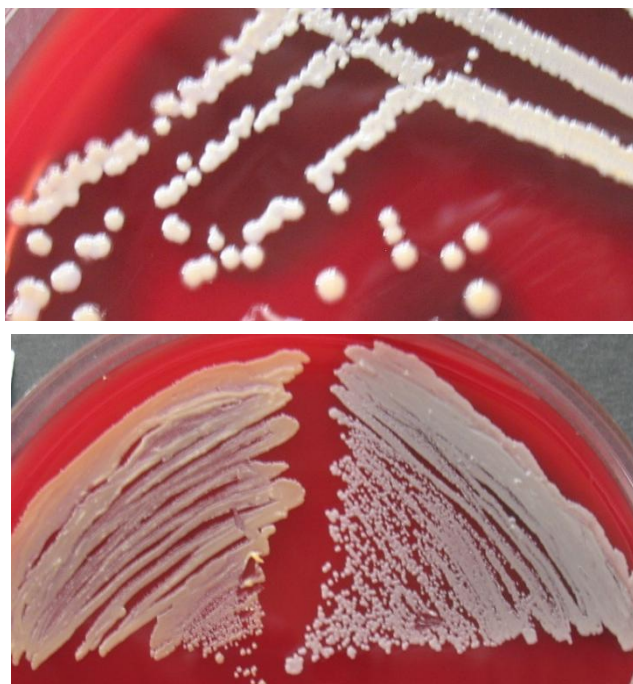
V testovaném souboru 338 izolátů *S. aureus* (od 92 pacientů) jsme obvykle pozorovali kolonie s různým stupněm pigmentace, od bílé přes světle žlutou až po charakteristicky žlutooranžovou. Beta hemolýzu, typickou pro *S. aureus*, vykazovala pouze přibližně polovina testovaných izolátů.



Obr. 23: Typický vzhled kolonií *S. aureus* na krevním agaru.

Pomalou rostoucích, slabě pigmentovaných izolátů s oslabenou hemolýzou jsme v našem souboru detekovali 28, a to u 10 pacientů – označili jsme je jako potenciální SCV izoláty, jejichž detailnímu popisu a analýze je věnována kapitola 5.7.

V 18 případech se testovaný izolát po kultivaci jevil jako směs dvou morfologických variant – obvykle hemolyzující a nehemolyzující kolonie (značeno H a NH), případně pigmentované a nepigmentované kolonie (značeno P a NP). Pokud byly oba morfotypy spolehlivě identifikovány pomocí MALDI-TOF MS jako *S. aureus*, byly dále analyzovány oba tyto izoláty. Pozdější analýza však ve většině těchto případů neprokázala odlišnosti v dalších vlastnostech, jako např. citlivosti na antibiotika, pulzotypu, spa typu nebo paletě kódovaných toxinů (tyto izoláty nejsou uvedeny v souhrnné tabulce P1 v příloze). Vyskytly se pouze 4 případy, kdy odlišná morfologie izolátů ze stejného vzorku od daného pacienta (pacienti 14, 31, 54 a 75) skutečně značila dva různé koinfikující kmeny (obr. 24).



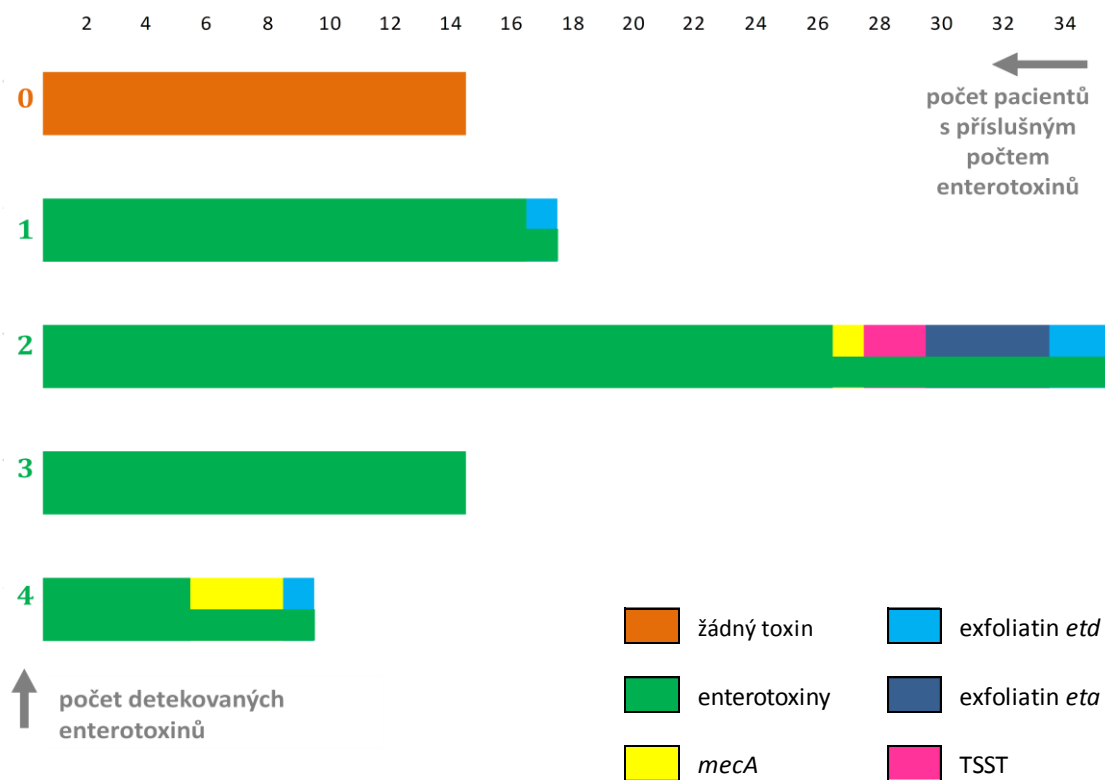
Obr. 24: Kmen 14/1 narostlý po 24 hodinách na krevním agaru. Na horním snímku lze rozlišit 2 odlišné morfotypy – kolonie hemolyzující a nehemolyzující. Na dolním snímku vyobrazeny samostatné morfotypy – vlevo nehemolyzující pigmentovaný morfotyp, vpravo hemolyzující nepigmentovaný morfotyp (po pasáži však nebyl rozdíl v hemolýze tak výrazný). Morfotypy se lišily i mírou rezistence kerytromycinu: nehemolyzující izolát vykazoval úplnou rezistenci k tomuto antibiotiku (MIC >256 µg/ml), zatímco hemolyzující pouze intermediární rezistenci (MIC 4 µg/ml).

5.2. IDENTIFIKACE POMOCÍ HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE MALDI-TOF

U všech vybraných sbírkových izolátů jsme ověřovali druhovou identifikaci pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie. Kromě dvou izolátů (*Streptococcus agalactiae* zaměněný vzhledově za SCV *S. aureus* u izolátu 32/1 SCV a kontaminace neidentifikovatelného původu u izolátu 102/1 B) se ve všech případech jednalo o *S. aureus* se spolehlivým skóre 2 a vyšším.

5.3. PRŮKAZ TOXINŮ

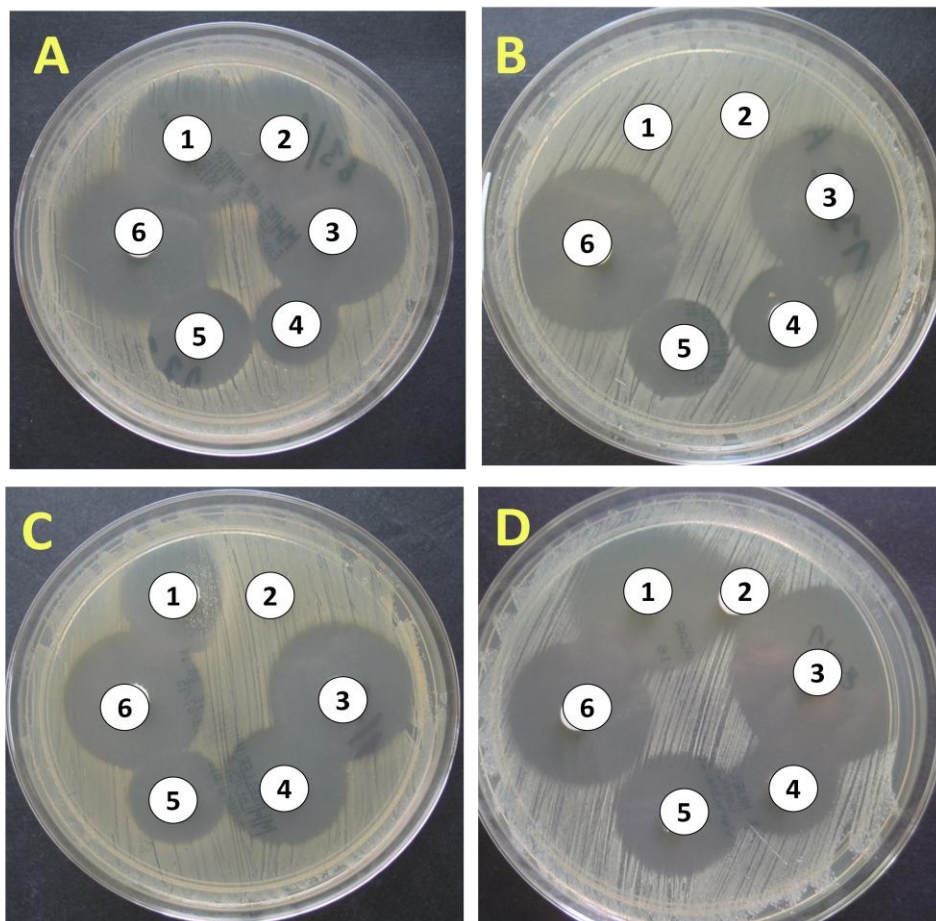
U všech izolátů *S. aureus* z let 2011-12 (244 izolátů od 89 pacientů) byly našimi kolegy z Masarykovy univerzity v Brně amplifikovány geny kódující toxiny, a to za pomoci metody multiplex-PCR (Růžičková *et al.* 2005). U 14 pacientů z celkových 89 nebyl za celé sledované období nalezen žádný izolát kódující toxiny, naproti tomu u 75 pacientů (84 %) se podařilo detekovat za sledované období minimálně jeden izolát kódující toxiny – vždy šlo o enterotoxiny), v některých případech pak v kombinaci s dalšími toxiny, jako jsou exfoliatiny (u 8 pacientů) nebo toxin syndromu toxického šoku (TSST; u 2 pacientů). V převážné většině případů byl profil toxinů kódovaných jednotlivými kmeny od daného pacienta v čase konstantní. Poměrně často izoláty *S. aureus* také nesly kombinaci několika enterotoxinů (kombinace dvou u izolátů od 35 pacientů, kombinace tří u izolátů od 14 pacientů, kombinace čtyř u izolátů od 9 pacientů). Nejčastěji detekovanými toxiny tohoto druhu byly SEG a SEI u izolátů od více než poloviny testovaných pacientů. Panton-Valentinův leukocidin (PVL) pozitivní *S. aureus* nebyl detekován u žádného pacienta.



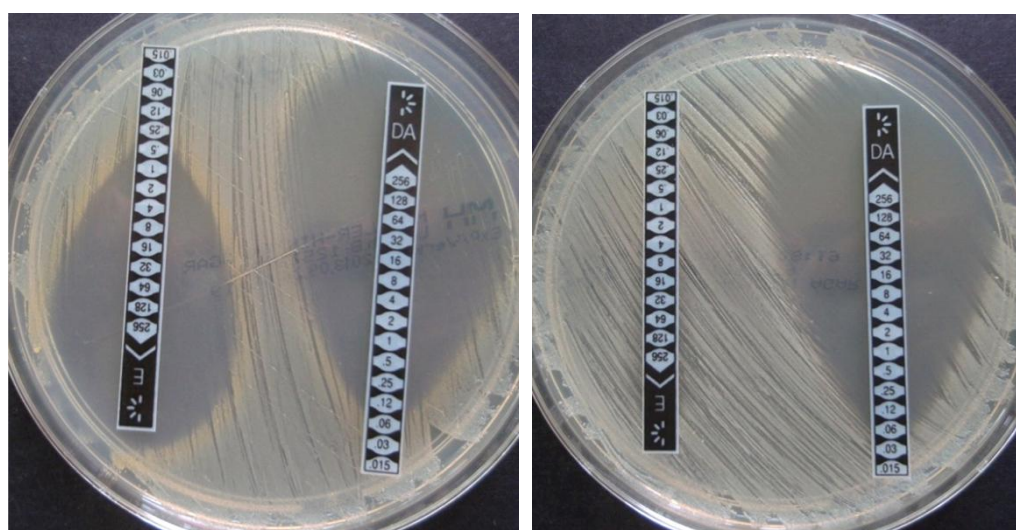
Obr. 25: Zastoupení toxinů detekovaných mezi izoláty pacientů s CF: Na vodorovné ose počet pacientů s příslušným počtem enterotoxinů, na svislé ose počet enterotoxinů od žádného po kombinaci čtyř. V každém sloupci navíc barevně vyznačeny i ostatní toxiny (exfoliatiny či toxin syndromu toxického šoku TSST), které byly detekovány u izolátů daného pacienta společně s uvedeným počtem enterotoxinů. Žlutě vyznačen gen *mecA*, typický pro kmeny MRSA. Pacienti, jejichž izoláty vykazovaly v průběhu sledovaného období různý počet toxinů, byli zařazeni do příslušné kategorie podle toho, jaký nejvyšší počet toxinů byl u nich detekován.

5.4. TESTOVÁNÍ CITLIVOSTI K ANTIBIOTIKŮM

Vyšetřovali jsme citlivost k šesti klinicky významným antibiotikům: erytromycinu (E), klindamycinu (DA), kotrimoxazolu (trimetoprim-sulfametoxazol, SXT), gentamicinu (CN), oxacilinu (OX) a cefoxitinu (FOX), a to nejprve diskovým difuzním testem (obr. 26) a poté pomocí Etestu (obr. 27).



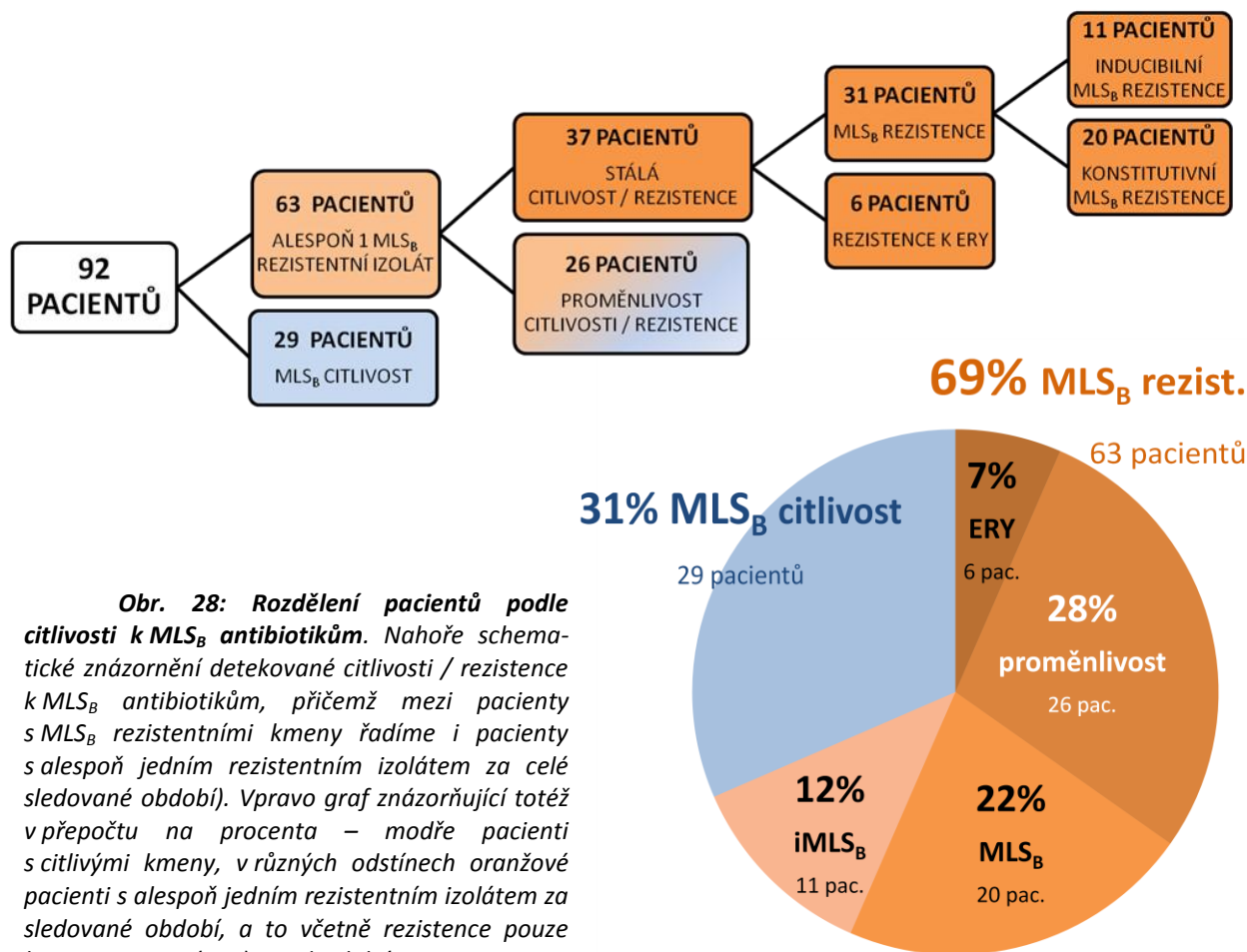
Obr. 26: Výsledky diskového difuzního testu se základními testovanými antibiotiky na MH médiu, kultivace 24 hodin při 37° (1 – klindamycin, 2 – erytromycin, 3 – kotrimoxazol, 4 – oxacilin, 5 – gentamicin, 6 – cefoxitin). A: Kmen citlivý ke všem antibiotikům (izolát 83/1), B: Kmen konstitutivně rezistentní k MLS_B antibiotikům (izolát 1/1), C: Kmen inducibilně rezistentní k MLS_B antibiotikům (izolát 14/4) vytvářející D zónu okolo disku s klindamycinem, D: Kmen, u kterého je citlivost k erytromycinu pouze snižená (izolát 80/1).



Obr. 27: Určení minimální inhibiční koncentrace (MIC) testovaného antibiotika pomocí Etestu (M.I.C.Evaluator, Oxoid): vlevo kmen citlivý k erytromycinu (E, MIC 0,5 $\mu\text{g/ml}$) i klindamycinu (DA, MIC 0,12 $\mu\text{g/ml}$), vpravo naopak kmen zcela rezistentní k erytromycinu a citlivý ke klindamycinu (MIC 0,06-0,12 $\mu\text{g/ml}$). Tento test není vhodný k měření MIC klindamycinu u kmenů s inducibilní MLS_B rezistencí.

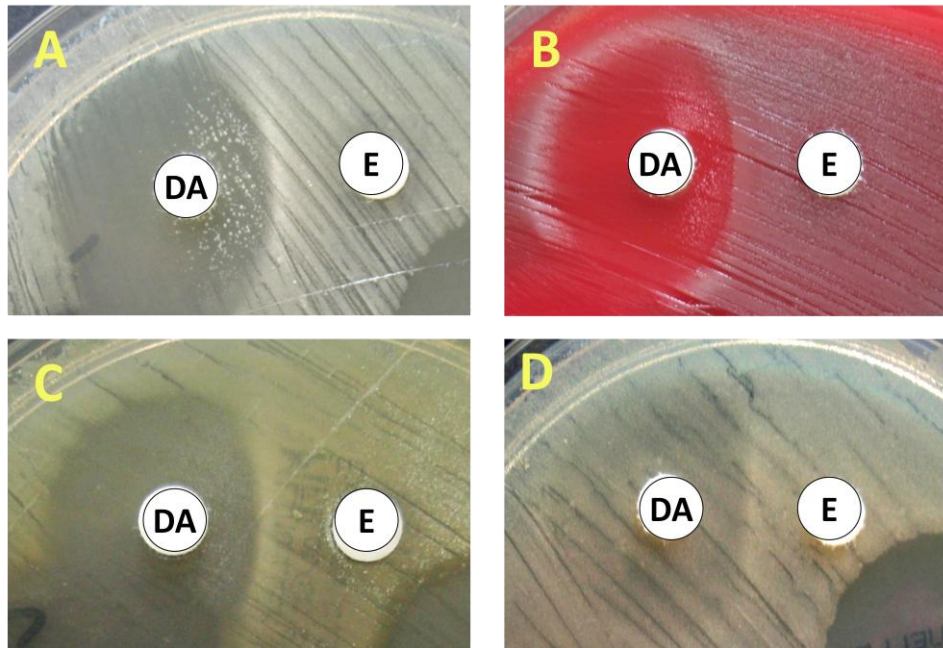
CITLIVOST K MLS_B ANTIBIOTIKŮM

Dýchací cesty třetiny pacientů (31 %; 29 z 92 pacientů) byly kolonizovány kmenem *S. aureus* citlivým k MLS_B antibiotikům, a to po celé sledované období (obr. 28).



Obr. 28: Rozdělení pacientů podle citlivosti k MLS_B antibiotikům. Nahoře schematické znázornění detekované citlivosti / rezistence k MLS_B antibiotikům, přičemž mezi pacienty s MLS_B rezistentními kmeny řadíme i pacienty s alespoň jedním rezistentním izolátem za celé sledované období). Vpravo graf znázorňující totéž v přepočtu na procenta – modře pacienti s citlivými kmeny, v různých odstínech oranžové pacienti s alespoň jedním rezistentním izolátem za sledované období, a to včetně rezistence pouze k erytromycinu (ERY) a inducibilní MLS_B rezistence (i MLS_B).

Alespoň jeden MLS_B rezistentní izolát za celé sledované období byl zachycen v případě 63 pacientů (69%). U 37 pacientů z této skupiny byla rezistence trvalým jevem po celé sledované období. Šest z nich neslo kmeny *S. aureus* s rezistencí pouze k erytromycinu (6 % výskyt v celém souboru). Rezistence současně ke klindamycinu i erytromycinu po celé sledované období byla zjištěna u stafylokoků od 31 pacientů (z výše uvedených 37 pacientů), z toho u třetiny z nich šlo o inducibilní charakter rezistence detekovatelný pouze D testem (obr. 29). U 26 pacientů došlo ke změnám v profilu rezistence *S. aureus*. U této skupiny pacientů byla detekována MLS_B rezistence, nicméně v průběhu sledovaného období vymizela nebo se např. objevila pouze u jednoho z mnoha izolátů *S. aureus* téhož pacienta. Nebylo výjimkou, že původní kmen, nahrazený kmenem novým (někdy i s jiným profilem rezistence), se později u daného pacienta znovu objevil.



Obr. 29: Různé typy D zóny detekované okolo disku s klindamycinem: Nahoře příklady inducibilní MLS_B rezistence s drobným nárůstem ve zploštělé části zóny blíže disku s erytromycinem (na MH agaru a krevním agaru), vlevo dole pak tatáž situace, avšak bez nárůstu v D zóně. Vpravo dole tzv. „mlhavá D zóna“ (Hazy D Zone), kterou však odečítáme jako plně rezistentní a vyskytla se u všech kmenů MRSA v testovaném souboru, ale i u některých kmenů citlivých k oxacilinu. Legenda: E – erytromycin, DA – klindamycin.

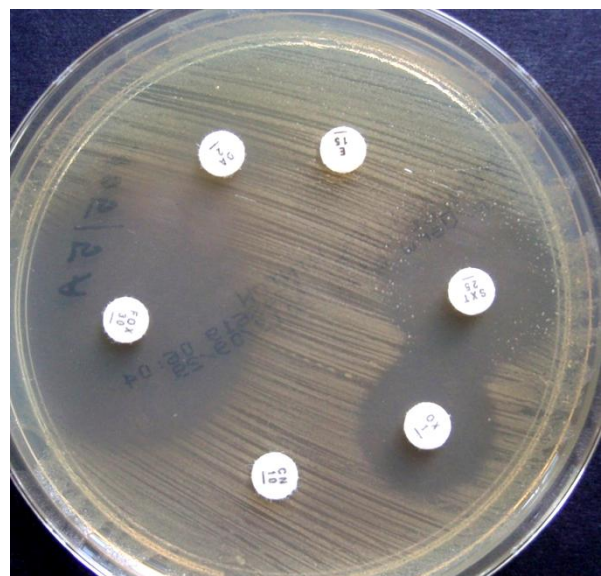
CITLIVOST K OSTATNÍM ANTIBIOTIKŮM

Ke kotrimoxazolu byly rezistentní izoláty od 13 pacientů (14% výskyt mezi sledovanými 92 pacienty), přičemž většinu z nich tvořily kmeny SCV (detailněji v kapitole 5.7.).

Úplná rezistence k oxacilinu byla detekována u izolátů od 5 pacientů (5% výskyt mezi sledovanými 92 pacienty), hraniční hodnota mezi citlivostí a rezistencí byla detekována u izolátů od dalších 4 pacientů. Všechny tyto kmeny byly označeny jako potenciální MRSA a dále podrobeny aglutinačnímu testu a amplifikaci genu *mecA* pomocí PCR (kapitola 5.5.2.).

Snížená či úplná rezistence ke gentamicinu byla zjištěna u izolátů od 15 pacientů (16% výskyt mezi sledovanými 92 pacienty). Průkazu determinant aminoglykosidové rezistence se věnuje kapitola 5.5.3.

Obr. 30: Diskový difuzní test u rezistentního izolátu 105/5, který byl plně rezistentní ke gentamicinu (CN), klindamycinu (DA), erytromycinu (E) a se sníženou citlivostí ke kotrimoxazolu (SXT).



5.5. PRŮKAZ MECHANISMŮ REZISTENCE U REZISTENTNÍCH KMENŮ *S. AUREUS*

5.5.1. PŘÍČINY MLS_B REZISTENCE KMENŮ *S. AUREUS*

U všech kmenů rezistentních k MLS_B antibiotikům jsme zjišťovali determinanty této rezistence. V první fázi jsme prováděli detekci genů rezistence typických pro stafylokoky (*ermA*, *ermB*, *ermC*, *msrA*), ve druhé fázi jsme potom u zbylých rezistentních kmenů bez determinanty hledali méně známé geny rezistence (*ereA*, *ereA*, *mefA*, *msrD*, *ermG*, *ermQ*, *ermT*, *ermF*, *erm43*, *mphC*) vyskytující se spíše u jednotlivých kmenů, a to sporadicky (Matsuoka *et al.* 2003, Roberts 2008). Kmeny, u kterých nebyla prokázána žádná determinanta MLS_B rezistence ani po opakované izolaci DNA, byly později vyšetřovány na mutace v cílových místech působení MLS_B antibiotik.

PRŮKAZ TYPICKÝCH GENŮ REZISTENCE

Při průkazu determinant rezistence pomocí PCR jsme se zaměřili nejprve na typické metylázy *ErmA*, *ErmB* a *ErmC*. Gen *ermA* byl prokázán u izolátů od 15 pacientů, přičemž u dvou z nich byl zachycen pouze u některých jejich izolátů (izoláty od pacientů 43 a 44) a u dalšího byla detekována tato determinanta v kombinaci s genem *ermC* (izolát od pacienta 76). Samotný gen *ermC* byl prokázán u izolátů od 12 pacientů, přičemž u dvou z nich šlo opět o detekci pouze u některých jejich izolátů (izoláty od pacientů 44 a 93). Gen *ermB* nebyl detekován u žádného izolátu.

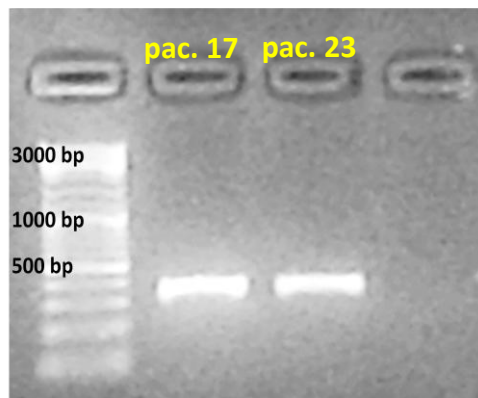
Přítomnost genu pro typickou efluxní pumpu *MsrA* byla zjišťována u všech izolátů s rezistencí k samotnému erytromycinu (izoláty od 6 pacientů s trvalou rezistencí k erytromycinu, u dalších 13 pacientů se tato rezistence vyskytla pouze u některých jejich izolátů), zvláště pokud byla citlivost k tomuto antibiotiku pouze snižená. Tento gen se podařilo prokázat u kmenů od 4 pacientů, přičemž u dvou z nich šlo kontinuální výskyt po celé sledované období, u jednoho z nich se tato determinanta, stejně jako rezistence k erytromycinu, objevila na začátku sledovaného období a poté na jeho konci. V posledním případě šlo o pacienta, u jehož izolátů *S. aureus* byla detekována také mutace v zásahovém místě MLS_B antibiotik (konkrétně v genu pro ribozomální protein L4) s pravděpodobnou ztrátou determinanty *msrA*.

PRŮKAZ NETYPICKÝCH GENŮ REZISTENCE

U MLS_B rezistentních izolátů bez typické determinanty jsme se pokusili detekovat méně známé geny pro metylázy rRNA, mezi které jsme zařadili *ermG*, *ermQ*, *ermT*, *ermF*, *erm43*. Přestože se nám nepodařilo získat pozitivní kontroly pro tyto determinanty, u dvou pacientů byla zjištěna přítomnost genu *ermT* (pacienti 23 a 17). Amplifikovaný fragment odpovídá tomuto produktu svou

velikostí (536 bp) a navíc i další charakteristiky těchto izolátů naznačují přítomnost determinanty *ermT* (podrobnosti uvedeny v kapitole 5.6.). Ostatní testované geny pro metylázy rRNA nebyly prokázány u žádného z izolátů naší sbírky.

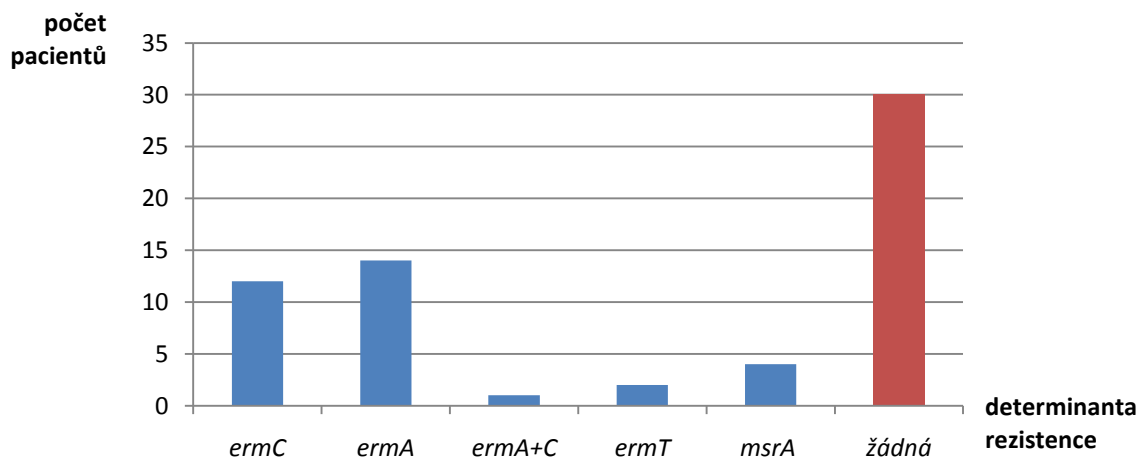
U kmenů s rezistencí k erytromycinu bez determinanty *msrA* jsme se pokusili detekovat geny pro efluxní pumpu MsrD, homologickou k MrsA, a pro efluxní pumpu MefA nacházenou u streptokoků, avšak neúspěšně. Přítomnost genů kódujících inaktivující enzymy se u stafylokoků běžně netestuje, nicméně my jsme se pokusili amplifikovat geny pro esterázy EreA a EreB a gen pro fosforylázu MphC, a to u kmenů s rezistencí k samotnému erytromycinu. Výsledek však byl ve všech případech negativní. Závěry z průkazu netypických determinant rezistence jsou pouze předběžné, k získání jistějších výsledků by byla nutná důkladná optimalizace s pozitivními kontrolami.



Obr. 31: Amplikon genu *ermT* u kmene od pacienta 17 a pacienta 23.

DETEKCE MUTACÍ V CÍLOVÝCH MÍSTECH PŮSOBNÍ MLS_B ANTIBIOTIK

Z celkových 63 pacientů s alespoň jedním MLS_B rezistentním kmenem se téměř u poloviny pacientů nepodařilo detekovat žádný gen zodpovědný za vykazovanou rezistenci (obr. 32). U všech kmenů rezistentních k MLS_B antibiotikům nebo pouze k erytromycinu bez prokázaného genu rezistence byly pomocí specifických primerů amplifikovány a sekvenovány klíčové oblasti ribozomu – domény II a V 23S rRNA a také geny pro ribozomální proteiny L4 (*rpID*) a L22 (*rpIV*).



Obr. 32: Determinanty rezistence detekované mezi kmeny rezistentními k MLS_B antibiotikům. Výška sloupce představuje počet pacientů, u jejichž rezistentních kmenů byl příslušný gen detekován; u některých pacientů se vyskytlo v průběhu sledovaného období více různých genů rezistence.

Mutace v konzervované oblasti ₇₄₈GAAAAGTGAGCGGA₇₆₁ domény II 23S rRNA nebyla detekována u žádného z testovaných kmenů (obr. 35). Bylo zjištěno pouze několik drobných inzercí a dvě mutace neznámého významu, ležící mimo konzervovanou oblast.

NCTC 8325	TTACGTTGAAAAGTGAGCGGATGAACTGAGGGTA
Pacient 3	TTACGTTGAAAAGTGAGCGGATGAACTGAGGGTA
Pacient 16	TTACGTTGAAAAGTGAGCGGATGAACTGAGGGTA
Pacient 24	TTACGTTGAAAAGTGAGCGGATGAACTGAGGGTA

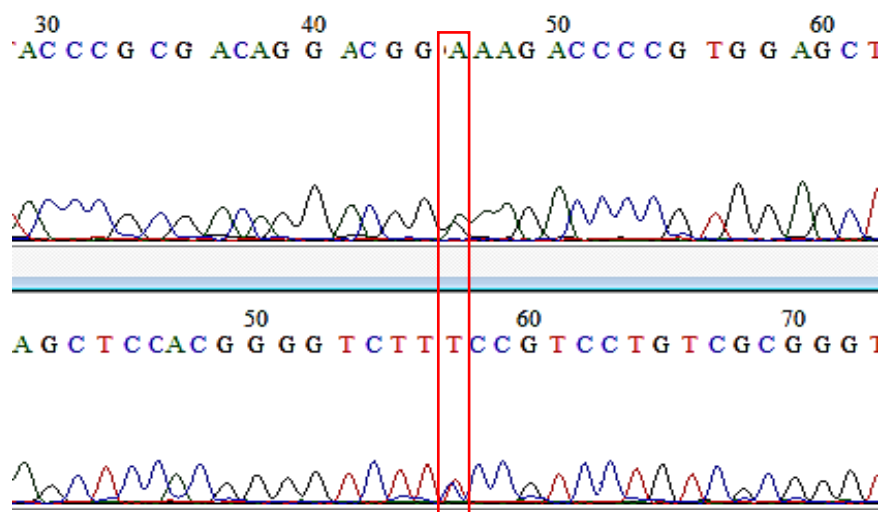
Obr. 35: Přímá (forward) sekvence části domény II 23S rRNA s vyznačenou klíčovou oblastí pro navázání MLS_B antibiotik (zde G748-A761, číslování podle *E. coli*). Uvedena nejprve sekvence typového kmene NCTC 8325, pod ní postupně tatáž oblast rRNA *S. aureus* od pacientů 3, 16 a 24.

Mutace v doméně V 23S rRNA byla detekována u 26 pacientů (28% prevalence mezi všemi pacienty). V případě čtyř z nich byla mutace v této oblasti detekována jen u některých vzorků za sledované období a došlo u nich ke změně příčiny rezistence, ať již šlo o jinou mutaci nebo o získání genu rezistence. V ostatních případech byl profil rezistence i s detekovanou mutací stabilní v čase u všech jejich vzorků, přičemž v jednom případě byla mutace doprovázena přítomností genu *ermA* (izolát 43/1). Nejčastěji šlo o mutaci A2058G (celkem u 24 pacientů), výjimečně pak o mutaci A2058T (pouze izoláty pacienta 52) nebo A2059G (izoláty pacientů 28 a 85).

NCTC 8325 A2058	:GATCTGCTGAGATGCAGGTTACCCGCGACAGGACGGAAA	GACCCCGTGGAGCTTT.
Pacient 88 A2058G	:CTCCTGCTGAGATGCAGGTTACCCGCGACAGGACGGGAA	GACCCCGTGGAGCTTT.
Pacient 52 A2058T	:AGGTCTGTGAGATGCAGGTTACCCGCGACAGGACGGTAA	GACCCCGTGGAGCTTT.
Pacient 85 A2059G	:CACCTGCTGAGATGCAGGTTACCCGCGACAGGACGGAGA	GACCCCGTGGAGCTTT.

Obr. 33: Přímá (forward) sekvence části domény V 23S rRNA s vyznačenou klíčovou oblastí pro navázání MLS_B antibiotik (zde A2056-A2060, číslování podle *E. coli*). Uvedena nejprve sekvence typového kmene NCTC 8325, pod ní postupně tatáž oblast rRNA *S. aureus* od pacientů 88 (se substitucí A/G v pozici 2058), 52 (se substitucí A/T v pozici 2058) a 85 (se substitucí A/G v pozici 2059).

U několika kmenů s mutací A2058G byla při analýze kvality sekvence zjištěna v pozici 2058 přítomnost jak guaninu, tak adeninu – pravděpodobně z důvodu většího počtu kopií operonů *rrn*, kdy se mutace může objevit v libovolném počtu kopií. Důslednou analýzou všech sekvencí domény V 23S rRNA u MLS_B rezistentních kmenů byly detekovány obdobné případy, kdy program BioEdit mylně označil kmen jako nemutovaný na základě toho, že adeninový signál v dané pozici převládá (byť jen nepatrně) nad např. guaninovým, jak ukazuje obrázek 34. Tento fenomén jsme označili jako A2058G* a byl zjištěn u kmenů od 7 pacientů, přičemž u 3 z nich tato mutace u pozdních izolátů vymizela. V případě pouhého náznaku signálu guaninu (naznačujícího zřejmě mutaci pouze v jedné kopii) jsme mutaci označili jako A2058G**; detekována byla u kmenů od 9 pacientů, přičemž u 3 z nich se tato mutace u pozdních izolátů rozšířila na všechny kopie operonu *rrn*.



Obr. 34: Přímá (nahore) a zpětná (dole) sekvence části domény V 23S rRNA včetně kvality jednotlivých osekvenovaných pozic (kmen 30/4). Červeným rámečkem vyznačena pozice A2058, kterou program vyhodnotil jako nemutovanou, ale je patrné, že v obou sekvencích byla v této pozici detekována i druhá, mutovaná báze (guanin) téměř ve stejné vysoké hladině, jako adenin. Dalo by se tedy předpokládat, že přibližně polovina kopií operonu *rrn* (z celkových 5 až 6 kopií) má tuto pozici mutovanou a druhá polovina naopak nemutovanou. Tato mutace byla označena jako A2058G*.

V genu *rpIV* pro ribozomální protein L22 nebyla v konzervované oblasti $_{80}\text{ANEGPTMKRFRPRAKGSASPI}_{100}$ detekována žádná známá mutace vyvolávající rezistenci k MLS_B antibiotikům. Detekovali jsme pouze mutaci Val50Ile neznámého významu (pacient 80).

V genu *rpID* pro protein L4 byly nalezeny různé substituce, z nichž většina byla tzv. tichá neboli synonymní (*silent, synonymous*) a nevedla ke změně kódované aminokyseliny. Nesynonymní mutace měnící smysl kodonu (*missense, non-synonymous*), detekované v konzervované oblasti genu *rpID* $_{63}\text{KPWKQKGTGRAR}_{74}$, byly zachyceny u izolátů rezistentních k erytromycinu od 10 pacientů (tabulka 20).

Tabulka 20: Mutace detekované v konzervované oblasti genu *rpID*. Podtržení pacienti nesli kmen s příslušnou mutací dlouhodobě (po dobu 2 a více let). U všech kmenů s mutovanou konzervovanou sekvencí genu *rpID* (L4) byla vždy detekována mutace Thr70Pro (fialově), v několika případech pak společně s mutací Gly69Ala (oranžově), Gly71Ser, výjimečně také Gly69Thr.

KMEN	SEKVENCE <i>rpID</i> V POZICÍCH 69-70-71	OZNAČENÍ MUTACE	DETEKOVÁNO U:
NCTC	GGA-ACA-GGT	-	typový kmen
27/1	GCA-CCA-AGT	Gly69Ala, Thr70Pro, Gly71Ser	pacient 3, 27, 95, 99
24/1	GCA-CCA-GGT	Gly69Ala, Thr70Pro	pacient 5, 24, 31, 61, 65, 80
80/8	ACA-CCA-GGT	Gly69Thr, Thr70Pro	pouze kmen 80/8

U všech pacientů, jejichž MLS_B rezistentní kmeny *S. aureus* nekódovaly žádnou z testovaných determinant, byly prokázány mutace v konzervovaných oblastech ribozomálních struktur, zejména v doméně V 23S rRNA a v genu *rpID*. Příčinou vysokého podílu detekovaných mutací by mohla být zvýšená mutabilita kmenů v našem souboru (podrobněji v kapitole 5.8.).

5.5.2. DETERMINANTY REZISTENCE KMENŮ MRSA

Všechny kmeny rezistentní k oxacilinu a cefoxitinu úplně nebo intermediálně (tj. na rozhraní citlivosti a rezistence) byly testovány latexovým aglutinačním testem pro rychlou diagnostiku MRSA pomocí detekce PBP2 (Denka Seiken) a také u nich byla prováděna detekce genu *mecA*, jehož přítomnost je pro ně typická. Jako MRSA byly prokázány všechny plně rezistentní kmeny (od 5 pacientů), které vykazovaly ve všech případech pozitivní aglutinaci. Pouze u těchto kmenů s pozitivním výsledkem aglutinačního testu byl detekován rovněž gen *mecA* (výsledky jsou uvedeny v tabulce 21).

Tabulka 21: Potvrzené kmeny MRSA se zmenšenou nebo nulovou zónou citlivosti při diskovém difuzním testu s antibiotiky oxacilinem (OX) a cefoxitinem (FOX); MIC pro oxacilin byla vyšší než 2 µg/ml. Všechny potvrzené kmeny MRSA vykazovaly současně i MLS_B rezistenci, téměř vždy s typickou mlhavou D zónou (označeno D*) okolo disku s klindamycinem. Podtržením vyznačení pacienti, od kterých byly kmeny MRSA izolovány opakovaně po celé sledované období.

PACIENT	VĚK	MLS _B	OX (cm)	FOX (cm)	MIC OX (µg/ml)	<i>mecA</i>	PBP2A	SPA TYP
18	14	MLS _B (D*)	0	12	16-32	+	+	t003
78	18	MLS _B (D*)	0	0	>256	+	+	t003
<u>79</u>	25	MLS _B (D*)	0	0	>256	+	+	t003
<u>97</u>	25	MLS _B (D*)	0	0	>256	+	+	t003
<u>106</u>	27	MLS _B	0	0	>256	+	+	t003

Naopak jako MSSA byly označeny kmeny se sníženou citlivostí k oxacilinu (14-16 cm), které však zůstaly plně citlivé k cefoxitinu a jejich MIC pro oxacilin byla nižší nebo rovna 2. Nebyl u nich detekován gen *mecA* ani jeho produkt PBP2a.

5.5.3. DETERMINANTY AMINOGLYKOSIDOVÉ REZISTENCE *S. AUREUS*

U všech kmenů s úplnou rezistencí nebo sníženou citlivostí ke gentamicinu (od 15 pacientů) byla provedena detekce genů aminoglykosidové rezistence, typických pro stafylokoky – konkrétně *aadC* (aminoglykosid-acetyltransferáza C), *aphA3* (aminoglykosid-fosforyláza A3) a *aacA-aphD* (kombinace acetyltransferázy a fosforylázy). U kmenů od všech pacientů s výjimkou jednoho (pac. 34) byl prokázán alespoň jeden z těchto tří genů, jak ukazuje tabulka 22. Citlivost kmenů od pacienta 34 ke gentamicinu však byla pouze lehce snížená. Nejčastěji detekovanou determinantou byl gen *aacA-aphD* (u kmenů od 7 pacientů) nebo jeho kombinace s genem *aadC* (u kmenů od 3 pacientů).

Tabulka 22: Pacienti nesoucí kmeny rezistentní k aminoglykosidům včetně výsledků diskového difuzního testu a Etestu pro gentamicin. Uvedena je rovněž souvislost s MLS_B rezistencí a detekovaný gen (popř. kombinace genů) aminoglykosidové rezistence.

PACIENT	MLS _B REZISTENCE	DETERMINANTA MLS _B REZISTENCE	ZÓNA REZISTENCE CN (cm)	MIC CN (µg/ml)	GEN
8	iMLS _B	<i>ermA</i>	9	32-64	<i>aphA3 + aacA-aphD</i>
25	citlivý	-	8	64	<i>aacA-aphD</i>
31	ERY » MLS _B	L4 » A2058G	0	128-256	<i>aacA-aphD</i>
32	ERY	<i>msrA</i>	14	4-8	<i>aphA3</i>
34 SCV	citlivý	-	14	chybí	-
35	citlivý	-	12	4	<i>aphA3</i>
45	MLS _B	A2058G	9	32	<i>aacA-aphD</i>
54	ERY	<i>msrA</i>	9	32-64	<i>aacA-aphD</i>
67	citlivý	-	9	32-64	<i>aadC + aacA-aphD</i>
69	MLS _B	A2058G	20!	chybí	<i>aadC</i>
72	citlivý	-	0	64-128	<i>aadC + aacA-aphD</i>
82	iMLS _B	<i>ermC</i>	7 » 0	64 » 256	<i>aacA-aphD</i>
92	MLS _B	A2058G	0	128-256	<i>aacA-aphD</i>
94	citlivý	-	9 » 0	64 » 128	<i>aadC + aacA-aphD</i>
105	MLS _B	A2058G	0	128	<i>aacA-aphD</i>

symbol „!” označuje nárůst rezistentních kolonií v inhibiční zóně

symbol » značí změnu během sledovaného období (změny profilu rezistence, příčiny rezistence, hodnoty MIC)

5.6. KLONÁLNÍ ANALÝZA SOUBORU IZOLÁTŮ *S. AUREUS*

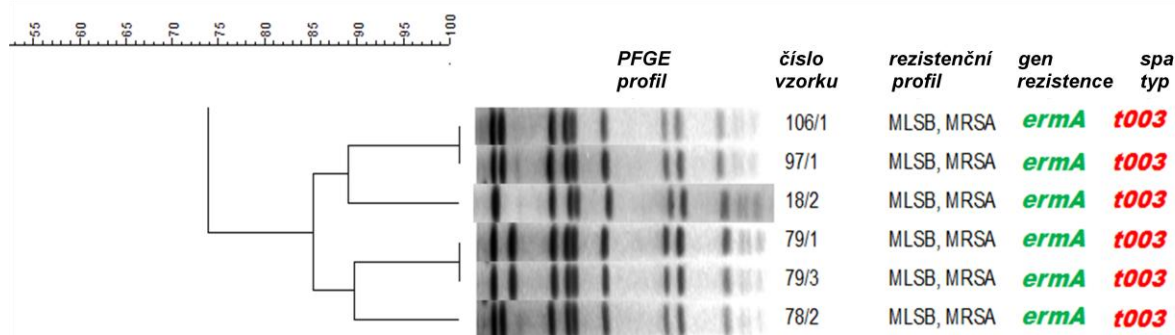
Ke klonální analýze jsme použili dvě odlišné metody; pulzní elektroforézu (PFGE) umožňující makrorestrikční analýzu DNA a dále spa typizaci, metodu založenou na jednolokusové sekvenaci. Výsledky jsou pro přehlednost rozděleny podle použité metody, vždy s komentářem k populační struktuře odhalené touto metodou, k souvislosti s detekovanou rezistencí a k proměnlivosti klonality v průběhu chronické infekce.

5.6.1. TYPIZACE NA ZÁKLADĚ MAKRORESTRIKČNÍ ANALÝZY

PFGE byla první metodou, kterou jsme použili pro klonální analýzu. Z důvodu časové náročnosti jsme touto metodou analyzovali pouze vzorky z let 2011-12 (244 izolátů od 89 pacientů). Restrikční profily všech testovaných vzorků jsme vyhodnotili za pomoci programu Bionumerics. Fotografie každého gelu byla jednotně optimalizována podle markerů, vymezených mezi testovanými vzorky. Jednotlivé fragmenty restrikčních profilů našich vzorků (představující velké úseky DNA, naštěpené restriktázou *Sma*I) byly označeny s rozlišením na fragmenty tzv. jisté a nejisté. Na základě tohoto označení pak byl vytvořen dendrogram příbuznosti jednotlivých vzorků

(Dice koeficient, optimalizace 1,5 %, tolerance 1 %, nejisté fragmenty nezařazeny), z kterého vyplývá vysoká heterogenita našeho souboru. Na úrovni 80% příbuznosti lze rozlišit 50 pulzotypů, přičemž k nejpočetněji zastoupenému pulzotypu náleží izoláty od 27 pacientů. Na úrovni 70% příbuznosti se soubor rozděluje už pouze na 31 pulzotypů. Přesto však na základě získaných výsledků můžeme vyloučit epidemické šíření určitých klonů mezi pacienty. Rovněž nebyla nalezena souvislost mezi profilem rezistence daného izolátu a jeho zařazením do pulzotypu.

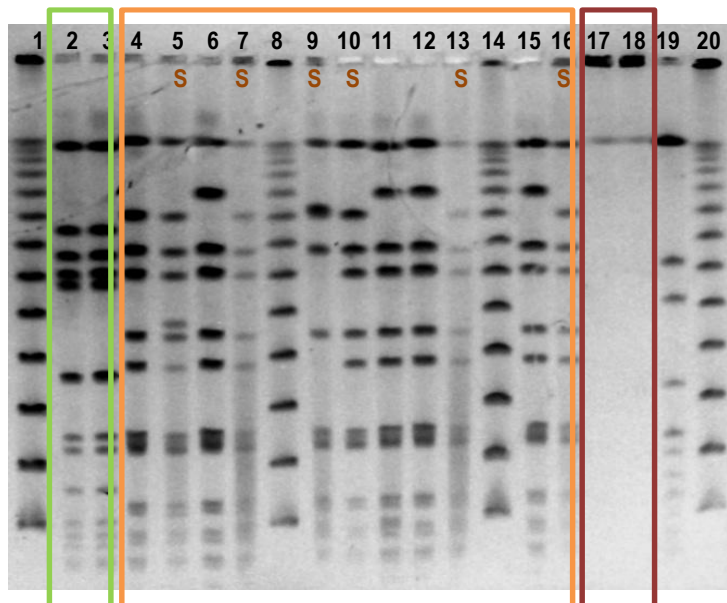
V tomto směru tvoří výjimku pouze kmeny MRSA (od 5 pacientů), které všechny patří ke stejné klonální linii a jejich pulzotyp je téměř totožný, nezávisle na tom, od kterého pacienta pocházejí. Je tedy pravděpodobné, že tyto vysoce rezistentní kmeny se šíří mezi pacienty v průběhu zdravotní péče. Pro všechny je navíc typická přítomnost genu *ermA*, determinanty MLS_B rezistence.



Obr. 36: Pulzotypy detekované u kmenů MRSA včetně některých dalších charakteristik. Všechny tyto kmeny patří ke stejné klonální linii.

U 21 pacientů z 89 bohužel nelze říci, jak se jejich makrorestrikční profil vyvíjel v čase, protože z období 2011-12 od nich máme pouze jeden vzorek, který bychom mohli použít k takovéto analýze. U ostatních 68 pacientů jsme se zaměřili na stabilitu makrorestrikčních profilů jejich izolátů *S. aureus* v čase. U 51 těchto pacientů byl zachycen stále se opakující makrorestrikční profil s případnými drobnými změnami: u 13 z nich došlo ke změně profilu o 1-3 fragmenty (blíže příbuzné klony detekované u daného pacienta, podle Tenover *et al.* 1995), zatímco u 38 pacientů byl zachycen profil zcela neměnný v čase (totožné klony detekované u daného pacienta). U zbylých 17 pacientů došlo během sledovaného období k dramatické proměně pulzotypu, nebyla však nalezena korelace konkrétních pulzotypů např. s profilem rezistence nebo profilem kódovaných toxinů.

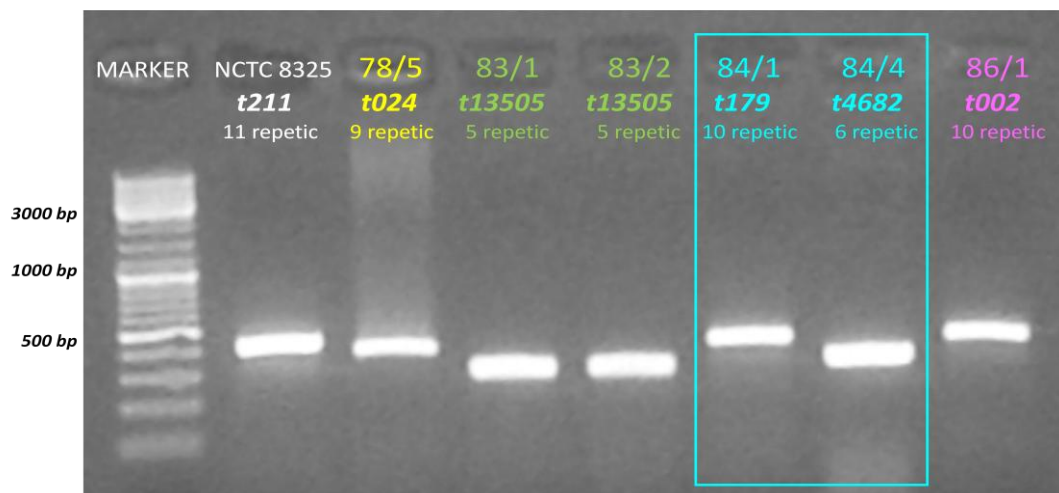
U izolátů od dvou pacientů (23 a 17) se ani opakovaně nepodařilo získat žádný makrorestrikční profil; označili jsme je tedy za netytovatelné touto metodou.



Obr. 37: Ukázka fotografie gelu z PFGE. V jamkách 1, 8, 14 a 20 je vždy marker. V jamce 2 a 3 (zelený rámeček) kmeny 99/1 a 99/2 (s ročním rozestupem), které mají totožný pulzotyp. V jamkách 4-7, 9-13, 15 a 16 (oranžový rámeček) kmeny pacienta 100, přičemž symbolem „S“ je vždy označen SCV izolát, zatímco neoznačené jsou mateřské izoláty – je tedy patrné, že přestože jde podle počtu proužků o blízké příbuzné kmeny, pulzotyp mateřských a SCV izolátů se poněkud liší. V jamkách 17 a 18 (hnědý rámeček) jsou kmeny 23/1 a 17/1, které i po zopakování celé metody nevykazují žádný pulzotyp, tj. jsou netyповatelné touto metodou.

5.6.2. TYPIZACE NA ZÁKLADĚ SEKVENACE GENU SPA

Spa typizace byla druhou metodou, kterou jsme použili ke klonální analýze. Tuto metodu jsme na našem pracovišti zaváděli nově, jako alternativu k „zlatému standardu“ PFGE. Protože výsledky jsme získali o poznání rychleji a spolehlivěji, analyzovali jsme touto metodou všechny izoláty z let 2011-13.



Obr. 38: Ověření úspěšnosti amplifikace regionu X genu spa pomocí gelové elektroforézy. U všech vzorků byla amplifikace úspěšná, jsou patrné rozdíly v délce amplifikovaných fragmentů (variabilní délka regionu X). Vzorky jsou barevně rozlišeny podle toho, od jakého pacienta pocházejí; na základě výsledků sekvenace jsou doplněny i údaje o detekovaných spa typech. Již z výsledků elektroforézy lze tedy vyčíst změny velikosti polymorfni oblasti genu spa – v modrém rámečku lze např. rozlišit, že u druhého izolátu od pacienta 84 došlo k delecii v regionu X, což se potvrdilo i sekvenací (rozestup mezi těmito izoláty byl 10 měsíců).

Mezi našimi 338 testovanými izoláty od 92 pacientů bylo detekováno 89 různých spa typů, z toho 13 spa typů se vyskytlo u alespoň tří různých pacientů (tabulka 23). Nejpočetněji zastoupené byly spa typy t002, t003, t065 a t127, detekované vždy u šesti různých pacientů. Celkově 67 detekovaných spa typů se vyskytlo vždy pouze u jednoho pacienta. Dvanáct z 89 detekovaných spa typů dosud nebylo popsáno a byly tedy vloženy do mezinárodní databáze (tabulka 24).

Tabulka 23: Nejčastější spa typy *S. aureus* detekované v našem souboru; uvedeny spa typy detekované u alespoň tří různých pacientů. Žlutě vyznačeny spa typy s frekvencí výskytu ve světě vyšší než 1 % (takto častých spa typů je ve světě 14, z nichž jsme nedetekovali spa typy t032, t008, t011, t034, t037, t021 ani t044). Pořadí podle četnosti v našem souboru jsme sestavili podle počtu pacientů, u nichž byl příslušný spa typ detekován.

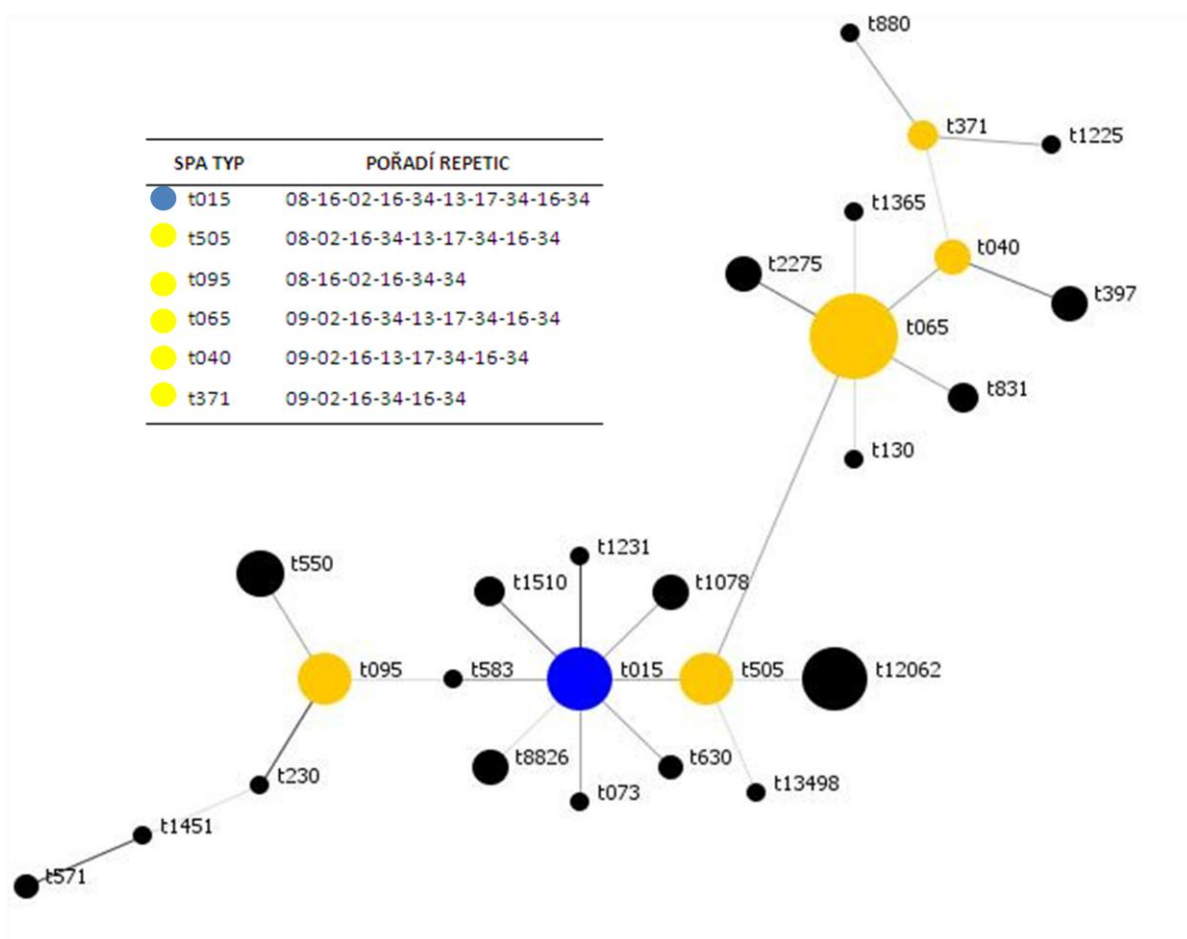
POŘADÍ DLE ČETNOSTI V NAŠEM SOUBORU	SPA TYP	FREKVENCE VÝSKYTU VE SVĚTĚ (%)*	KLONÁLNÍ KOMPLEX PODLE NAŠÍ ANALÝZY (COST ≤6)	PŘÍŘAZENÝ MLST SEKVENČNÍ TYP	PRAVDĚPODOBNÝ PŮVOD PODLE MLST (ROLO ET AL. 2012)
1.-4.	t003	9,32	spa-CC 002	ST-5, ST-225	nemocniční
1.-4.	t002	6,67	spa-CC 002	ST-5, ST-231	nemocniční
1.-4.	t127	2,13	spa-CC 015	ST-1	komunitní
1.-4.	t065	0,55	spa-CC 015	ST-45, ST-46	nemocniční
5.	t015	1,14	spa-CC 015	ST-45	nemocniční
6.-10.	t084	1,85	spa-CC 346	ST-15, ST-18	komunitní
6.-10.	t019	1,08	spa-CC 015	ST-30	komunitní
6.-10.	t091	0,90	spa-CC 346	ST-7	komunitní
6.-10.	t024	0,74	spa-CC 024	ST-8	komunitní
6.-10.	t095	0,05	spa-CC 015	-	-
11.-13.	t012	1,70	spa-CC 015	ST-30	komunitní
11.-13.	t056	0,26	spa-CC 349	ST-101	-
11.-13.	t148	0,29	spa-CC 349	-	-

*frekvence výskytu ve světě převzata z <http://spa.ridom.de/frequencies.shtml> (k datu 31.7.2015)

Tabulka 24: Nově popsané spa typy vložené do databáze, včetně druhu repetice a jejich pořadí v polymorfním regionu genu spa. Detekovali jsme i jednu originální repetici, která byla označena číslem 649.

NOVÝ SPA TYP	POŘADÍ REPETIC	ČÍSLO PACIENTA
t13495	07-23-12-21-12-17-13-20-17-12-12-17	16
t13497	14-12-23-02-34-34-34	107
t13498	234-02-16-34-34-17-34-16-34	27
t13499	26-23-13-23-31-05-17-25-17-25-23-20	51
t13500	26-23-21-17-34	36 a 44
t13501	08-34-13-13-17-34-16	12
t13502	26-23-17-34-20-17-20-17-34-20-17-12-17-16	51
t13503	07-23-21-17-34-12-12-23-12-23	24
t13504	07-23-12-21-17-34-387-34-33-34	17
t13505	26-23-133-17-16	83
t13806	04-21-12-41-20-10-12-12-17	80
t13812	07-12-21-17-13-649-34-33-34	35

Jednotlivé spa typy byly softwarem Ridom StaphType seřazeny do příbuzných spa-klonálních komplexů (spa-CC), kdy bylo většinou možné určit „zakladatele“ každého tohoto komplexu. Při rozdělení na základě maximálně 4 změn (*costs*) v repeticích polymorfního regionu genu *spa* bylo zjištěno v našem souboru 12 spa-klonálních komplexů, 19 samostatných spa typů (singletonů) a 5 spa typů bylo z analýzy vyřazeno kvůli příliš krátké detekované sekvenci repetice (o čtyřech nebo méně repeticích). Třemi nejpočetnějšími spa-klonálními komplexy byly spa-CC 015, spa-CC 346/084 a spa-CC 002. Do nejpočetněji zastoupeného komplexu spa-CC 015 spadalo 26 spa typů detekovaných u izolátů od 30 pacientů, tj. od 32 % pacientů z našeho souboru (obr. 39).



Obr. 39: Nejpočetněji zastoupený klonální komplex spa-CC 015 v testovaném souboru izolátů *S. aureus* za období červen 2011 až prosinec 2013, a to na základě rozdělení podle počtu změn v polymorfní oblasti genu *spa*. Modře označen „společný zakladatel“ (founder), žlutě „zakladatelé nižšího řádu“ (subfounders). Délka spojnic jednotlivých spa typů znázorňuje relativní evoluční vzdálenost mezi nimi a barva těchto čar představuje poměrný počet změn, ke kterým došlo – čím světlejší odstín, tím více ztrát. Velikost bodů znázorňujících spa typy odpovídá počtu izolátů, u nichž byly detekovány, avšak v našem případě je tato informace nerelevantní (z důvodu různého počtu izolátů od každého pacienta).

Dále jsme se zaměřili na souvislost mezi detekovanými spa typy a rezistencí izolátů *S. aureus*. Všechny kmeny MRSA vykazovaly totožný spa typ t003, který podle příbuznosti s ostatními spa typy našeho souboru vytvářel singleton, nicméně při vyšší toleranci změn (rozdělení na základě maximálně 6 změn v repetičích polymorfního regionu genu *spa*) byl řazen ke klonálnímu komplexu spa-CC 002. Kmeny, u nichž se ve sledovaném období objevila determinanta *ermC*, spadaly často do klonálních komplexů spa-CC 002 (u 6 z 13 pacientů) nebo spa-CC 346/084 (u 4 z 13 pacientů). Kmeny s determinantou *ermA* se řadily nejčastěji rovněž do klonálního komplexu spa-CC 002 (u 7 z 16 pacientů), což souvisí s rezistencí těchto kmenů k oxacilinu. MLS_B rezistentní kmeny s determinantou *ermT* vykazovaly spa typy z klonálního komplexu spa-CC 015 – u jednoho pacienta spa typ t571 (repetice 08-16-02-25-02-25-34-25), u druhého t1451 (repetice 08-16-02-25-34-25), což naznačuje jejich příbuznost a možné klonální šíření tohoto genu pro metylázu. Příbuznost těchto dvou spa typů nám poskytla důkaz pro potvrzení detekce jejich determinanty *ermT*, a to na základě podobnosti s kmenem popisovaným v literatuře, jenž měl příbuzný spa typ, determinantu *ermT* a byl netypovatelný na základě makrorestrikce enzymem Smal (Vandendriessche *et al.* 2011).

Při analyzování stability spa typů v čase jsme museli z analýzy vyřadit izoláty 9 pacientů, od nichž máme za sledované období pouze jediný vzorek. Ze zkoumaných 83 pacientů, od kterých jsme měli k dispozici alespoň 2 vzorky, se spa typ v průběhu období 2011-13 změnil téměř v polovině případů (47 %; izoláty od 39 pacientů). Jednalo se o změnu různého charakteru (tabulka 25). U 14 pacientů došlo pouze k menší přestavbě regionu X genu *spa* v důsledku inzercí, delecí nebo duplikací jedné či několika málo repetic; zatímco u 25 pacientů byla zjištěna změna závažnější, vedoucí někdy až ke změně detekovaného klonálního komplexu. Získání nového klonálního komplexu korelovalo obvykle se změnou makrorestrikčního profilu a souvisí pravděpodobně se získáním nového kmene *S. aureus*. Drobné či větší změny spa typu někdy korelovaly s profilem rezistence nebo jinými charakteristikami daného izolátu, nebylo to však pravidlem. U druhé skupiny pacientů (53 %; 44 pacientů) se naopak spa typ jejich izolátů v průběhu infekce ve sledovaném období nezměnil.

Tabulka 25: Příklady detekovaných spa typů *S. aureus* u vybraných pacientů v souvislosti s MLS_B rezistencí jejich kmenů. Legenda: inz. – inzerce; subst. – substituce.

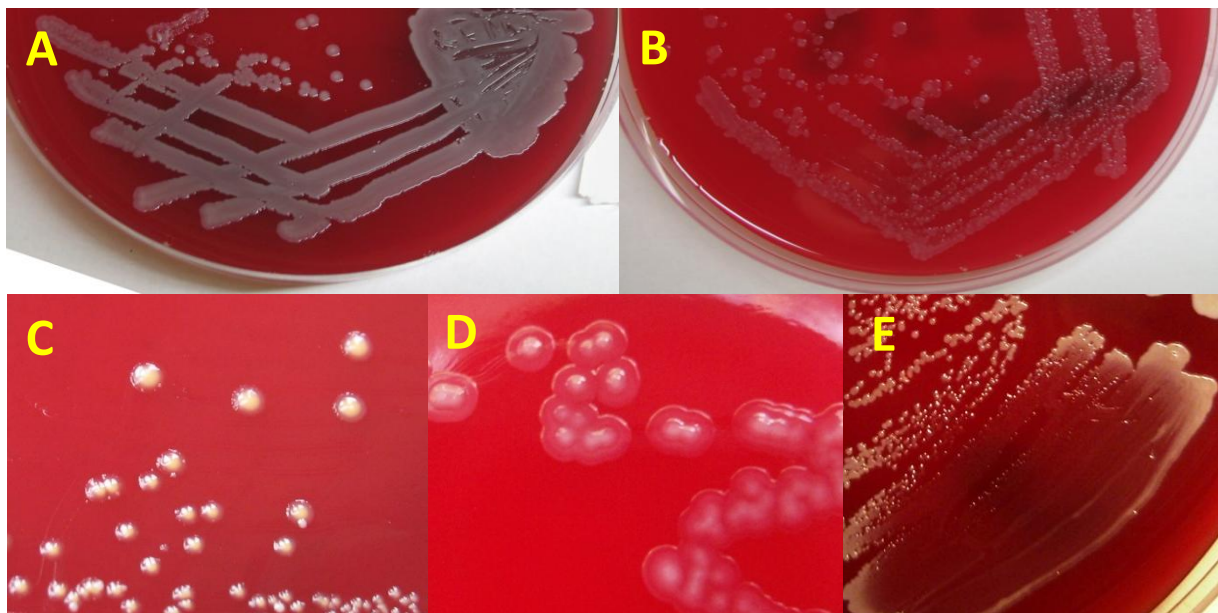
IZOLÁT	DATUM ODBĚRU	PŘÍČINA MLS_B REZISTENCE	SPA KLONÁLNÍ KOMPLEX	SPA TYP	POŘADÍ REPETIC	KOMENTÁŘ
5/1	8/2011	-	spa-CC 002	t002	26-23-17-34-17-20-17-12-17-16	<i>neměnnost spa typu, přitom však změna příčiny rezistence</i>
5/2B	11/2011	A2058G	spa-CC 002	t002	26-23-17-34-17-20-17-12-17-16	
5/3	8/2012	<i>rplD</i> mutace	spa-CC 002	t002	26-23-17-34-17-20-17-12-17-16	
5/5	10/2013	-	spa-CC 002	t002	26-23-17-34-17-20-17-12-17-16	
24/1	11/2011	<i>rplD</i> mutace	spa-CC 346/084	t13503	07-23-21-17-34-12-12-23-12-23	<i>koexistence 2 spa linií, které se vyvíjejí (inz. u t3272)</i>
24/2	4/2012	-	spa-CC 015	t1231	08-16-02-16-34-13-17-34-16-34-16-34	
24/3	3/2013	<i>rplD</i> mutace	spa-CC 346/084	t3272	07-23-21-17-34-12-12-23-02-12-23	
27/1	11/2011	<i>rplD</i> mutace	spa-CC 015	t13498	234-02-16-34-34-17-34-16-34	<i>koexistence 2 spa linií, které se vyvíjejí (subst. u t065)*</i>
27/2	2/2013	A2058G	spa-CC 015	t065	09-02-16-34-13-17-34-16-34	
27/3	9/2013	-	spa-CC 148	t148	07-23-12-21-12-17-20-17-12-12-17	
30/3	12/2011	A2058G	spa-CC 015	t1365	09-34-34-13-17-34-16-34	<i>neměnnost příčiny rezistence a současně měnící se spa typ (delece)</i>
30/4	11/2012	A2058G	spa-CC 015	t1225	09-34-34 - 16-34	
30/5	7/2013	A2058G	spa-CC 015	t130	09-34 - 13-17-34-16-34	
37/4	3/2013	-	spa-CC 015	t065	09-02-16-34-13-17-34-16-34	<i>nahrazení citlivého kmene rezistentním</i>
37/5	11/2013	<i>ermC</i>	spa-CC 002	t002	26-23-17-34-17-20-17-12-17-16	
38/1	8/2011	-	spa-CC 127	t2000	07-23-13-23-21-16-34-33-13	<i>koexistence 2 citlivých spa linií, které se vyvíjejí (delece u t127)</i>
38/6	6/2012	-	spa-CC 127	t2000	07-23-13-23-21-16-34-33-13	
38/7	1/2013	-	singleton	t7595	04-34-17-32-22-17-23-24	
38/8	11/2013	-	spa-CC 127	t127	07-23 - 21-16-34-33-13	
77/1	8/2011	-	spa-CC 024	t9340	<u>11-12-21-17-34-24-34-17-34-22-25</u>	<i>sourozenci sdílející 2 klonální linie, které se v každém z nich vyvíjejí jinak; dočasné nahrazení invazivním klonem MRSA</i>
77/4, 77/6	7/2012, 8/2013	-	spa-CC 122	t019	<u>08-16-02-16-02-25-17-24</u>	
78/1	8/2011	-	spa-CC 024	t024	<u>11-12-21-17-34-24-34-22-25</u>	
78/2	12/2011	MRSA, <i>ermA</i>	singleton	t003	26-17-20-17-12-17-17-16	
78/4	5/2012	-	spa-CC 122	t019	<u>08-16-02-16-02-25-17-24</u>	
78/5, 78/7	7/2012, 8/2013	-	spa-CC 024	t024	<u>11-12-21-17-34-24-34-22-25</u>	
93/2	8/2011	<i>ermC</i>	spa-CC 002	t579	26-23-17-17-20-17-12-17-16	<i>SCV a NCV kmeny mají totožnou determinantu rezistence, ale odlišnou spa linii; u SCV postupně dochází k delecím</i>
93/2 scv	8/2011	A2058G	spa-CC 349**	t056	04-20-12-17-20-17-12-17-17	
93/6	11/2011	<i>ermC</i>	spa-CC 002	t579	26-23-17-17-20-17-12-17-16	
93/6 scv	11/2011	(<i>ermC</i>)	spa-CC 349**	t1312	04-20-12-17 - 17	
93/8	3/2012	<i>ermC</i>	spa-CC 002	t579	26-23-17-17-20-17-12-17-16	
93/8 scv	3/2012	(<i>ermC</i>)	spa-CC 349**	t1312	04-20-12-17 - 17	

* k záměně repetic došlo vlivem jedné bodové mutace, např. r234 se od r09 liší pouze v substituci A/G v podtržené pozici: GAGGAAGACAGCAACAAACCTGGT

** pro názornost zde bylo upřednostněno zařazení SCV kmenů do spa-CC s tolerancí 6 změn v polymorfním regionu genu spa, neboť při menší toleranci se rozpadaly na singletony

5.7. SCV *S. AUREUS*

Mezi všemi 338 analyzovanými izoláty z let 2011-13 jsme detekovali 28 potenciálních SCV izolátů od 10 pacientů z celkových 92. Kritériem byl růst na krevním agaru v typických drobných či průhledných koloniích, případně snížený růst na chudém médiu typu MH agaru. Fenotypově rostly tyto SCV izoláty nejčastěji jako tzv. „kolonie tvaru volského oka“ (*fried eggs colonies*), případně jako tečkovité drobné kolonie (*pinpoint colonies*).



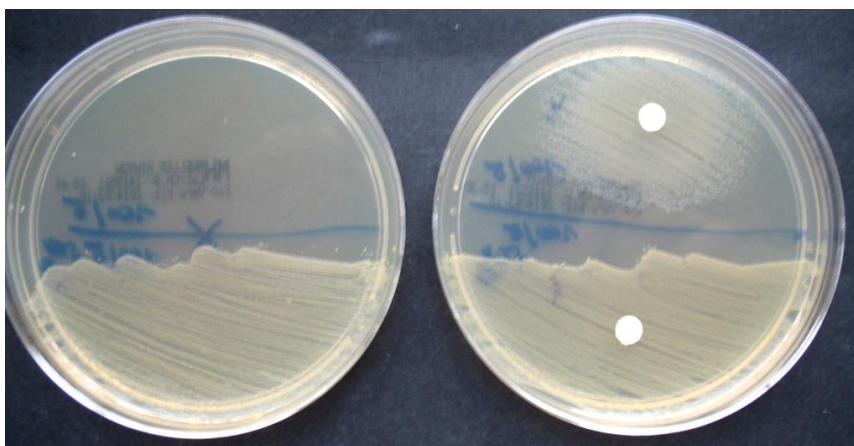
Obr. 40: Morfologie kmenů SCV *S. aureus*. Nahoře mateřský kmen 34/5 (A) a jeho SCV varianta 34/5 SCV (B). Dole zobrazena morfologie SCV izolátů – zleva kolonie tvaru volského oka u vzorků 44/1 SCV (C) a 100/3 SCV (D), méně časté drobné kolonie tečkovitého tvaru pak u vzorku 73/3 (E).

Typický izolát SCV *S. aureus* byl tvořen směsí několika morfotypů (obr. 41), mnohdy také v kombinaci s jejich mateřským kmenem. Pokus o oddělení jednotlivých morfotypů SCV z takového izolátu byl ve většině případů neúspěšný, nicméně při genetické analýze se od sebe tyto morfotypy nelišily. Kolonie vzhledově připomínající mateřský kmen získané z tohoto směsného SCV izolátu odpovídaly genotypově původnímu mateřskému kmeni. U více než poloviny pacientů s SCV kmeny jsme pozorovali reverzi těchto kmenů zpět k mateřskému fenotypu, popř. mohlo jít o pouhé nahrazení rychleji rostoucím mateřským kmenem.



Obr. 41: Různé morfotypy v rámci jednoho geneticky homogenního izolátu SCV *S. aureus* (izolát 100/3 SCV).

K potvrzení SCV charakteru izolátů *S. aureus* jsme použili kultivaci na MH agaru, na kterém tyto „trpasličí“ varianty nedokážou růst, a kultivaci na tomtéž agaru s přidaným diskem napuštěným látkou, k níž by mohly být auxotrofní – tymidinem, heminem či menadionem (obr. 42). Izoláty, které vytvořily spojitý nárůst již na samotném MH agaru, byly označeny jako NCV. U všech ostatních izolátů byla prokázána auxotrofie k tymidinu, neboť na MH agaru rostly pouze v blízkosti disku s tymidinem – jednalo se o 21 izolátů od 10 pacientů (11 % pacientů z testovaného souboru), přičemž u 5 pacientů se „trpasličí“ varianta *S. aureus* vyskytla opakovaně ve sledovaném období. Je vysoce pravděpodobné, že u kmenů auxotrofních k tymidinu došlo k jedné nebo více mutacím v genu *thyA*. Tento auxotrofní požadavek je u SCV kmenů od pacientů s CF nalézán nejčastěji.



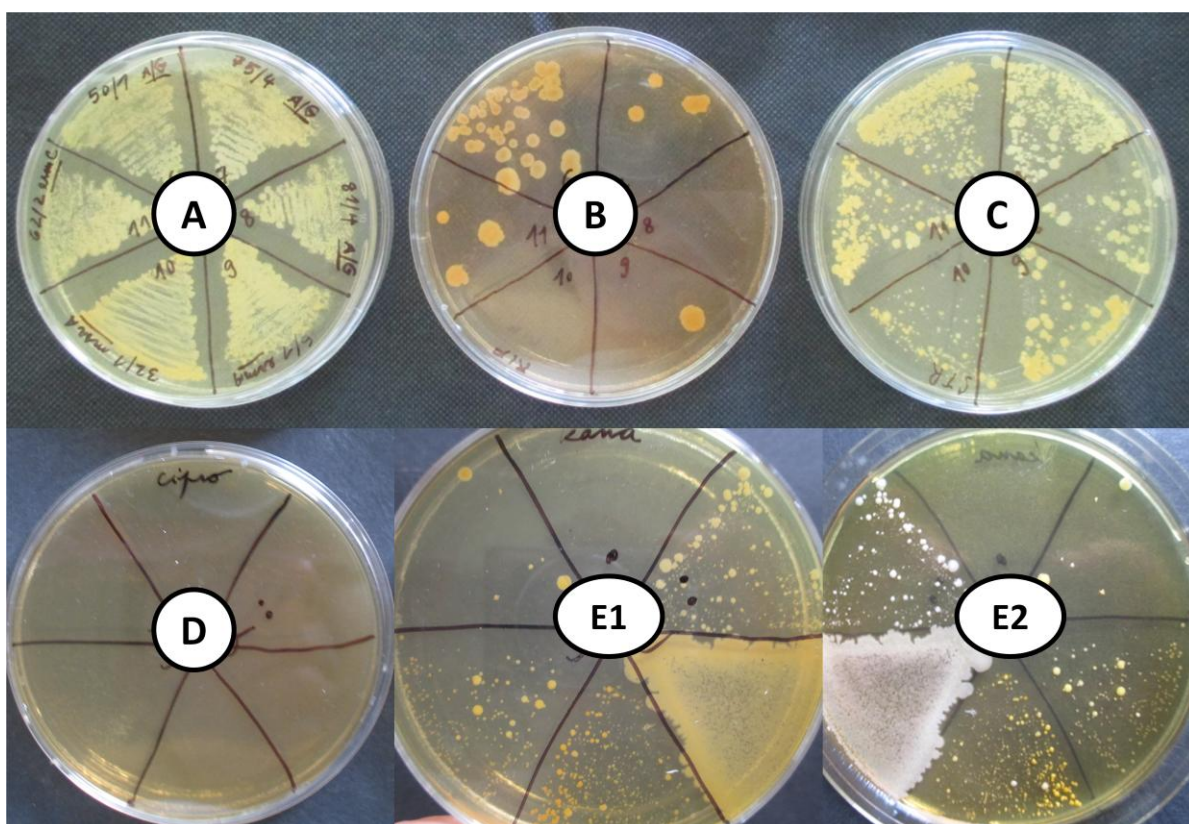
Obr. 42: Testování auxotrofie na MH agaru (vlevo) a na MH agaru s disky napuštěnými tymidinem (vpravo): nahoře na obou miskách SCV izolát rostoucí jen v okolí disku napuštěného tymidinem, dole na obou miskách NCV izolát rostoucí na MH agaru souvisle bez auxotrofního požadavku.

Pokud jde o rezistenci SCV kmenů, u 9 z 10 pacientů (90 %) byly rezistentní ke kotrimoxazolu a v případě dvou pacientů také ke gentamicinu (20 %). MLS_B rezistence se u SCV kmenů vyskytovala v případě 9 pacientů z 10 (90 % prevalence mezi pacienty s SCV kmeny), u dvou pacientů byla však detekována pouze mírně snížená citlivost k erytromycinu bez zjištěné příčiny. U zbylých 7 pacientů byly prokázány zejména mutace v pozicích A2058 nebo A2059 23S rRNA (SCV kmeny od 5 pacientů), případně determinanta *ermC* (SCV kmeny od 2 pacientů, přičemž u jednoho z nich byla na počátku sledovaného období zjištěna rovněž mutace A2058G).

Spa typ většiny kmenů SCV se nelišil od jejich mateřských kmenů, pouze u jednoho pacienta (93) se ve sledovaném období vyskytoval NCV *S. aureus* a současně SCV *S. aureus* s úplně jiným spa typem, který se navíc v průběhu infekce pozměnil (delece 4 repetice). K deleci zřejmě došlo také u kmenů SCV i NCV *S. aureus* pacienta 85, které vykazovaly velmi krátkou oblast repetice v polymorfním regionu genu *spa* (pouze 3 repetice).

5.8. TESTOVÁNÍ HYPERMUTABILITY

Zejména z důvodu detekce velkého podílu mutací zodpovědných za MLS_B fenotyp jsme se rozhodli testovat mutabilitu všech analyzovaných kmenů. Nejprve byly pomocí otiskového testu při kultivaci v přítomnosti rifampicinu vytipovány kmeny s předpokládanou zvýšenou mutační frekvencí, tj. kmeny silně rostoucí i pod selekčním tlakem tohoto antibiotika. Kromě rifampicinu jsme chtěli testovat mutabilitu i s jinými antibiotiky, avšak žádné jiné z testovaných se při optimalizaci metody neukázalo jako vhodné. Na agaru se streptomycinem a kanamycinem rostlo téměř u všech kmenů mnoho kolonií, navíc často morfologicky rozrůzněných (obr. 43, C a E), na agaru s ciprofloxacinem naopak nerostl žádný kmen (obr. 43, D).



Obr. 43: Misky s narostlými kulturami *S. aureus*, přenesenými pomocí raznice při otiskovém testu (pohled na misku zespoda) – zobrazen typický růst *S. aureus* na BHI agaru s přidávanými antibiotiky. Je patrné, že kanamycin, streptomycin i ciprofloxacin jsou v použité koncentraci nevhodné pro testování hypermutability *S. aureus*. Naopak rifampicin umožňuje rozlišit různou míru potenciální hypermutability.

- A – miska s narostlou kulturou na BHI agaru bez antibiotika;
- B – miska s toutéž otisknutou kulturou na BHI agaru s rifampicinem (100 $\mu\text{g/ml}$);
- C – miska s toutéž otisknutou kulturou na BHI agaru se streptomycinem (300 $\mu\text{g/ml}$);
- D – miska s otisknutou kulturou na BHI agaru s ciprofloxacinem (50 $\mu\text{g/ml}$);
- E – miska s otisknutou kulturou na BHI agaru s kanamycinem (50 $\mu\text{g/ml}$), E1 pohled zespoda, E2 pohled shora na otevřenou misku.

Testované kmeny od 88 % pacientů (80 z 91 pacientů) nevykazovaly na BHI agaru s rifampicinem o koncentraci 100 µg/ml žádnou nebo téměř žádnou hypermutabilitu; jeden pacient nesl kmen rezistentní k rifampicinu, tj. nebylo možné jej touto metodou otestovat (tabulka 26). Potenciální hypermutátoři byli detekováni u 12 % pacientů (11 z 91 pacientů), přičemž u 3 z nich šlo dle našich kritérií o velmi silně hypermutátorové kmeny.

Tabulka 26: Rozdělení pacientů do skupin podle potenciální hypermutability jejich izolátů *S. aureus*. Potenciální hypermutátoři (slabí a silní hypermutátoři) byli detekováni u 11 pacientů. Nejvyšší hypermutabilita byla detekována u kmenů od pacientů 50, 92 a 93 s přibližně 60-80 koloniemi vyrostlými na BHI s rifampicinem. Podtržení jsou pacienti s hypermutátorovými kmeny, u nichž byla detekována *MLS_B* rezistence vyvolaná mutací. Pacienti 34, 57 a 78 nesli kmeny citlivé k *MLS_B* antibiotikům.

POTENCIÁLNÍ HYPERMUTABILITA	PRŮMĚRNÝ POČET KOLONIÍ NA MISCE S RIFAMPICINEM	POČET PACIENTŮ S TAKTO MUTABILNÍMI KMENY
NENÍ HYPERMUTÁTOR	0-1 kolonií	33
VELMI SLABÝ HYPERMUTÁTOR	2-5 kolonií	47
SLABÝ HYPERMUTÁTOR	6-20 kolonií	7 (pacienti <u>27</u> , <u>28</u> , <u>31</u> , <u>34</u> , <u>57</u> , <u>78</u> , <u>88</u>)
SILNÝ HYPERMUTÁTOR	nad 20 kolonií	4 (pacienti <u>50</u> , <u>80</u> , <u>92</u> , <u>93</u>)
REZISTENTNÍ K RIFAMPICINU	plošný růst	1 (pacient 82)

Pozn.: Hraniční hodnoty pro toto orientační rozdělení do skupin jsme si zvolili sami; testovány byly ve většině případů pouze 1-2 izoláty od každého pacienta.

U slabých i silných potenciálních hypermutátorů *S. aureus* od 8 pacientů (z výše uvedených 11; viz podtržení v tabulce 26) byla detekována *MLS_B* rezistence, vyvolaná ve všech těchto případech mutací. Vždy šlo buď o mutaci 23S rRNA v pozici A2058 (u 5 pacientů), o mutaci v genu *rpID* (u 1 pacienta) nebo o jejich kombinaci (u 2 pacientů). U dvou pacientů z této skupiny jsme navíc prokázali ve sledovaném období SCV *S. aureus* (pacient 34 a pacient 93). *MLS_B* fenotyp byl přítomný u všech 4 pacientů se silně hypermutabilními kmeny.

Mezi SCV kmeny *S. aureus* z našeho souboru se vyskytl 1 silný hypermutátor (u pacienta 93, přičemž NCV kmen byl pouze velmi slabě hypermutabilní) a 1 slabý hypermutátor (u pacienta 34). Velmi slabě hypermutabilní kmeny byly zjištěny také u pacienta 89. U ostatních testovaných SCV kmenů jsme nedetekovali zvýšenou mutabilitu.

U vybraných 16 kmenů (vybraní slabí hypermutátoři, všichni silní hypermutátoři, kmeny bez hypermutability a NCTC *S. aureus*) od 12 pacientů byl po částech amplifikován a následně osekvenován gen *mutS* a částečně také gen *mutL* (první polovina jeho sekvence) – klíčové komponenty MMR. V sekvenci genu *mutS* typového kmene se vyskytuje mutace Glu840Lys. U ostatních testovaných vzorků jsme zjistili přítomnost nesynonymních mutací v tomto genu, které

vedly k záměnám aminokyselin, zejména Asn181His, Asn373Asp, Thr415Met a Leu811Ser (vyznačeny barevně v tabulce 27).

Tabulka 27: Detekované mutace v genech *mutS*, *mutL* a z nich plynoucí záměny aminokyselin (u *mutL* sekvenována pouze jeho první polovina). Žlutě – kmeny s předpokládanou silnou hypermutabilitou; tučně – mutace nesynonymní; barevně podtrženy nejčastěji detekované mutace; červeně vyznačeny delece.

KMEN	HYPER-MUTABILITA	MUTACE V GENU <i>mutS</i>	MUTACE V GENU <i>mutL</i>
NCTC	není	Glu840Lys	-
23/1	velmi slabý	Asn181His , Ser201Thr, Thr415Met, Asn373Asp, Leu811Ser	-
27/1	slabý	Asn181His , Thr415Met , Asn373Asp , Asn588Asp, Leu811Ser , Ser814Cys	Ile189Val
28/1	slabý	Asn181His , Thr415Met , Asn373Asp, Tyr552Phe, Asn588Asp, Leu811Ser , Ser814Cys	-
31/1a	slabý	-	-
34/2 SCV	slabý	Asn181His , Leu811Ser , Leu813Val, Phe835Leu	-
34/5 SCV	slabý	Asn181His , Leu811Ser , Leu813Val, Phe835Leu	-
34/7	slabý	Leu128Phe , Asn181His , Leu811Ser , Leu813Val, Phe835Leu	-
50/1	silný	Leu128Phe , del931G	del324A
57/1	slabý	Asn181His , Thr415Met , Asn 373Asp, Tyr552Phe, Asn588Asp, Leu811Ser , Ser814Cys	-
73/3	není	-	-
80/8	silný	Leu128Phe , Ala709Gly	-
88/2	slabý	Asn181His , Thr415Met , Asn 373Asp, Ser369Phe , Tyr552Phe, Asn588Asp, Leu811Ser , Ser814Cys	del191-201
92/2	silný	Phe24Ile , Asn181His , Val239Ala , Thr415Met , Asn373Asp , Gln531His , Leu811Ser	Ala203Arg
93/6	není	-	-
93/6 SCV	silný	Pro728Thr	-

Výsledky testování hypermutability však považujeme za předběžné, neboť k přesnějším výsledkům by byla nutná další optimalizace, postupné osekvenování druhé poloviny genu *mutL* a zejména stanovení mutační frekvence jednotlivých kmenů.

6. DISKUZE

Praktickou náplní této diplomové práce byla fenotypová i genotypová charakterizace 338 izolátů *S. aureus* zachycených v letech 2011 až 2013 z DCD 92 českých pacientů s cystickou fibrózou. Jedinečnost této sbírky tkví především v možnosti porovnat vlastnosti izolátů od téhož pacienta s rozestupem několika let a sledovat změny, ke kterým dochází v průběhu chronické infekce. Prevalence *S. aureus* dosahovala 29 % mezi všemi pacienty s tímto autozomálně recesivním onemocněním, kteří jsou v péči motolského Centra CF (318 z celkových 589 v ČR), což je oproti ostatním zemím hodnota spíše nižší, srovnatelná např. se Švýcarskem (Schneider *et al.* 2008).

Pozorovali jsme rozrůzněnost *S. aureus* již na úrovni fenotypu. Beta hemolýza byla detekována přibližně u poloviny testovaných izolátů, což může souviset s jejich klinickým původem a chronickou povahou infekce, kdy běžně dochází k útlumu virulence. Heterogenita prostředí DCD pacientů s CF poskytuje variabilní podmínky pro vznik subpopulací v rámci totožného bakteriálního kmene, jako je tomu např. u variant SCV. Pouze ve 4 případech značila odlišná morfologie izolátů ze stejného vzorku od daného pacienta dva skutečně různé koinfikující kmeny. U 75 % pacientů byl ve sledovaném období detekován alespoň jeden izolát kódující 1-4 enterotoxiny, u 8 pacientů v kombinaci s exfoliatiny a u 2 pacientů v kombinaci s TSST. U žádného izolátu včetně MRSA nebyl detekován PVL toxin.

Stěžejní částí této práce byla analýza rezistence *S. aureus* k MLS_B antibiotikům. Prevalence MLS_B rezistence u klinických izolátů *S. aureus* obvykle dosahuje přibližně 30 % (Urbášková *et al.* 2002, Schmitz *et al.* 1999). Z dýchacích cest 69 % pacientů (63 pacientů) z našeho souboru byl ve sledovaném období zachycen alespoň jeden izolát *S. aureus* rezistentní k MLS_B antibiotikům. Přibližně u třetiny těchto pacientů došlo ve sledovaném období ke změnám profilu rezistence a nelze je tedy jednoznačně zařadit do níže uvedených kategorií. U většiny trvale rezistentních kmenů šlo o konstitutivní charakter MLS_B rezistence (20 pacientů), vyskytl se mezi nimi však i poměrně vysoký podíl inducibilní MLS_B rezistence (11 pacientů) a izolátů rezistentních k erytromycinu a současně citlivých k ostatním zástupcům MLS_B antibiotik (6 pacientů). U 22 pacientů z celého testovaného souboru (24 %) se alespoň jednou za sledované období vyskytl izolát inducibilně rezistentní k MLS_B antibiotikům, který může být v klinické praxi snadno přehlédnut a způsobit pak selhání léčby těmito antibiotiky. Z toho důvodu se v současné době velmi doporučuje provádět tzv. D test k detekci této formy rezistence.

U poloviny pacientů s MLS_B rezistentními kmeny (33 pacientů) se podařilo prokázat geny rezistence kódující metylázy ErmA, ErmC nebo efluxní pumpu MsrA. Vysoký počet kmenů bez běžně známých determinant MLS_B rezistence, shodný s výsledky pilotní studie provedené dříve na našem

pracovišti, nás vedl k provedení důkladné rešerše za účelem výběru méně běžných genů MLS_B rezistence a jejich průkazu. Byly vybrány geny *ereA*, *ereB*, *mefA*, *msrD*, *ermG*, *ermQ*, *ermT*, *ermF*, *erm43* a *mphC*, z nichž se nakonec povedlo prokázat gen pro metylázu ErmT, a to u izolátů od dvou různých pacientů. U všech zbylých pacientů s MLS_B rezistentními izoláty bez determinanty (přibližně polovina všech pacientů s detekovanou MLS_B rezistencí *S. aureus*) jsme prokázali mutace v cílových místech působení MLS_B antibiotik. V převážné většině případů šlo o mutace v konzervované oblasti genu *rplD* (podobně u Prunier *et al.* 2005) detekované u kmenů od 10 pacientů a o substituce A2058G v doméně V 23S rRNA (podobně u Prunier *et al.* 2002) u kmenů od 24 pacientů. V doméně II 23S rRNA i v genu *rplV* pro protein L22 bylo mezi testovanými izoláty zjištěno pouze několik mutací neznámého významu, ležících mimo konzervované oblasti. Výhodou pro *S. aureus* je vícekopiová povaha genů *rrl* pro 23s rRNA, umožňující různou míru rezistence a pohotovější přizpůsobení aktuální antibiotické léčbě (Tait-Kamradt *et al.* 2000). Je-li většina kopií genů *rrl* nemutovaná, tato záměna může být při softwarovém vyhodnocování přehlédnuta – v našem případě by takto zůstala neidentifikovaná příčina rezistence u izolátů od 13 pacientů s mutací A2058G* nebo A2058**. Zjištěná vysoká prevalence mutací vyvolávajících MLS_B rezistenci je velmi neobvyklá (Schmitz *et al.* 2000) a pravděpodobně souvisí s léčbou pacientů, kterým byl podáván azitromycin po dlouhou dobu v subterapeutických dávkách díky příznivým protizánětlivým účinkům (Prunier *et al.* 2003, Hansen *et al.* 2009, Tkadlec *et al.* 2015).

Již bylo zmíněno, že u 26 pacientů došlo v průběhu sledovaného období ke změnám v citlivosti k antibiotikům: např. ke vzniku rezistence u pacienta s původně citlivým kmenem, k obnovení citlivosti u pacienta s rezistentním kmenem, nebo ke zvýšení či snížení míry rezistence u rezistentního kmene (podobně také ve studii Prunier *et al.* 2003). S tím často souvisí změna mechanismu rezistence, kdy může u bakteriálního kmene např. vzniknout mutace a není tedy již nutné kódovat determinantu na plasmidu. Pacient také může být infikován novým kmenem, který je zřejmě schopen koexistovat po dlouhou dobu vedle kmene původního. Tyto změny v citlivosti k antibiotikům by mohly souviset se zdravotním stavem pacienta nebo použitou antibiotickou léčbou.

Rezistence *S. aureus* k oxacilinu se vyskytovala poměrně zřídka, a to u 5 % pacientů (5 pacientů) – nejmladšímu bylo 14 let. U všech těchto kmenů MRSA byl detekován gen *mecA*, jeho produkt PBP2a a současně také konstitutivní MLS_B rezistence s determinantou *ermA*. Multirezistence je pro kmeny MRSA typická (Melter *et al.* 2003, Schmitz *et al.* 2000). Vzhledem ke klonální podobnosti by se tyto kmeny MRSA mohly stát snadno šířitelnou hrozbou, proto je nutné dodržovat přísný separační režim v Centru CF. I přes v posledních letech téměř neměnnou

prevalenci rezistence k oxacilinu mezi kmeny *S. aureus* ČR je nutné situaci neustále monitorovat (Bergerová *et al.* 2006).

Rezistenci *S. aureus* k aminoglykosidům jsme detekovali u 16 % pacientů (15 pacientů). Zjištěné determinanty rezistence odpovídaly světovým studiím: nejčastěji byl příčinou rezistence gen *aacA-aphD* (u 11 pacientů), u 4 pacientů se tento gen vyskytoval v kombinaci s genem *aphA3* nebo *aadC*. U jednoho pacienta se nepodařilo detekovat žádný gen rezistence k aminoglykosidům, podle diskového difuzního testu však byla jeho citlivost ke gentamicinu pouze lehce snížena, což může souviset s jeho SCV charakterem.

Klonální struktura analyzovaného souboru byla vysoce heterogenní, a to nezávisle na použité metodě. Makrorestrikční analýzou pomocí PFGE jsme na úrovni 80 % příbuznosti rozlišili 50 pulzotypů, přičemž k nejpočetněji zastoupenému pulzotypu se řadily izoláty od téměř třetiny pacientů. Mezi zařazením izolátu do pulzotypu a jeho profilem rezistence však nebyla nalezena signifikantní shoda, což vylučuje možnost šíření rezistentních klonů mezi pacienty. Výjimku v tomto směru představovaly pouze všechny kmeny MRSA, které tvořily samostatný pulzotyp a jejichž makrorestrikční profily byly téměř totožné. Všechny kmeny MRSA sdílely také stejný spa typ t003 patřící k nejrozšířenějším klonům MRSA v českých nemocnicích, tzv. Rýnsko-hessenskému klonu – je tedy pravděpodobné, že pacienti byli infikováni těmito kmeny při hospitalizaci. U izolátů od dvou pacientů se ani opakovaně nepodařilo získat žádný makrorestrikční profil. Označili jsme je tedy za netyповatelné PFGE. Z pozdější analýzy vyplynulo, že jde v obou případech o izoláty rezistentní k MLS_B antibiotikům s determinantou *ermT*, s níž je typicky spojována právě netyповatelnost pulzní elektroforézou při použití restriktázy *SmaI* (Vandendriessche *et al.* 2011)

Pomocí spa typizace jsme mezi 338 izoláty 92 pacientů detekovali 89 různých spa typů, z nichž 12 dosud nebylo popsáno. Nejpočetněji zastoupené spa typy v našem souboru byly t002, t003, t065 a t127 detekované vždy u izolátů od 6 různých pacientů. Tři z nich (t002, t003 a t127) patří mezi 6 nejčastějších světových spa typů. Některé spa typy nejčastěji zastoupené v našem souboru jsou rovněž hojné napříč Evropou – jde o t003, t002 a t127, t084, t015, t091, t012, t024 (Grundmann *et al.* 2010). Pomocí softwaru Ridom StaphType byly naše izoláty seřazeny do 12 klonálních komplexů; třemi nejpočetnějšími spa-klonálními komplexy byly spa-CC 015, spa-CC 346/084 a spa-CC 002. Do nejpočetnějšího klonálního komplexu spa-CC 015 spadalo 26 spa typů detekovaných u třetiny pacientů z našeho souboru. Pro účely typizace izolátů *S. aureus* se nám více osvědčila spa typizace, zejména pro svou časovou nenáročnost a snadné objektivní vyhodnocování.

V otázce klonality *S. aureus* jsme se zaměřili také na stabilitu klonů v čase. Na základě PFGE jsme mohli porovnat profily časných a pozdních izolátů u 68 pacientů, kdy u 51 z nich byl zachycen tentýž makrorestrikční profil s případnými drobnými změnami, zatímco u 17 pacientů

došlo ve sledovaném období k výrazné proměně pulzotypu. Protože však byla PFGE provedena pouze u izolátů z let 2011-2012, neposkytují tyto výsledky tak komplexní pohled jako výsledky spa typizace z let 2011-2013. Podle výsledků spa typizace se v průběhu sledovaného období změnil spa typ *S. aureus* téměř u poloviny pacientů: v některých případech došlo k výměně infikujícího kmene, jindy se spa typ lišil pouze drobnými změnami, které spíše souvisí s adaptačními ději v průběhu infekce. Tyto změny někdy korelovaly s profilem rezistence, nebylo to však pravidlem. Získání nového klonálního komplexu korelovalo obvykle také s rozsáhlou změnou makrorestrikčního profilu a souvisí pravděpodobně se získáním nového kmene *S. aureus*. U několika pacientů byla patrná koexistence dvou odlišných klonů *S. aureus* s jejich střídavým záchytem. K velmi podobným výsledkům došla Kahl *et al.* 2005.

SCV fenotyp byl zachycen u 21 izolátů *S. aureus* od 10 pacientů (11 % pacientů), u 5 z nich opakovaně. Můžeme říci, že tato hodnota prevalence je srovnatelná s rozsáhlejšími evropskými studiemi u pacientů s CF se stafylokokovou infekcí, přestože v některých zemích byla detekována prevalence mnohem vyšší. Rozdílná míra výskytu SCV je dána pravděpodobně odlišnými terapeutickými postupy v jednotlivých centrech CF, s tím že vyšší míra výskytu SCV pozitivně koreluje s léčbou kotrimoxazolem. Všechny naše SCV izoláty vykazovaly auxotrofii k tymidinu, což je v kontextu CF typické a souvisí zřejmě rovněž s použitím kotrimoxazolu k léčbě těchto pacientů (Besier *et al.* 2008). V několika případech SCV izoláty v průběhu analýzy revertovaly k normálnímu NCV fenotypu, což potvrzuje jejich nestabilitu. V poslední době však bylo prokázáno, že koexistence SCV i NCV kolonií jednoho bakteriálního kmene a možnost „přepínání“ mezi nimi je součástí běžného exponenciálního růstu *S. aureus*, a to bez jakéhokoli selekčního tlaku (Edwards 2012, Tuscherr *et al.* 2011). Klonálně byly SCV izoláty totožné se svými mateřskými izoláty s výjimkou jednoho pacienta, jehož SCV a NCV izoláty se klonálně značně lišily. SCV kmeny od 9 z 10 pacientů (90 %) byly rezistentní ke kotrimoxazolu. Stejně hodnoty (90 %) u nich dosahovala také prevalence MLS_B rezistence, přičemž 6 z 9 pacientů neslo SCV kmeny rezistentní díky mutaci v doméně V 23S rRNA. Z toho důvodu jsme předpokládali, že SCV kmeny budou vykazovat zvýšenou hypermutabilitu oproti NCV kmenům.

Vzhledem k vysokému podílu detekovaných mutací v 23S rRNA jsme se rozhodli prověřit hypermutabilitu kmenů z našeho souboru. Podle orientačního otiskového testu jsme se podle nárůstu pod selekčním tlakem rifampicinu pokusili rozlišit potenciální mutátory od „nemutátorů“. Potenciální hypermutátoři byli detekováni u 12 % pacientů (11 z 91 pacientů), přičemž u 3 z nich šlo dle našich kritérií o velmi silně hypermutátorové kmeny. U 8 z těchto 11 pacientů byly detekovány hypermutabilní kmeny s MLS_B rezistencí, a to ve všech případech vyvolanou mutací. Mezi SCV kmeny jsme zvýšenou mutabilitu prokázali pouze u dvou pacientů, přičemž u jednoho z nich šlo o

silně hypermutabilní a u druhého o slabě hypermutabilní kmen. Jedná se však zatím o předběžnou studii, při které jsme prověřili pouze 1-2 izoláty od každého pacienta.

U vybraných 16 kmenů s různou potenciální mutabilitou jsme sekvenovali jejich geny *mutS* a částečně také *mutL*. Detekovali jsme mutace v genu *mutS*, např. Asn181His, Asn373Asp, Thr415Met nebo Leu811Ser, které již byly v literatuře spojovány s hypermutátorovým fenotypem, a to nejen v kontextu CF (Prunier *et al.* 2003, Wang *et al.* 2013). Tři z těchto záměn jsou přítomny rovněž u kmene *S. aureus* MRSA252 (Prunier a Leclercq 2005). Kromě toho jsme u analyzovaných mutátorů zjistili další nesynonymní mutace s neznámým významem, často s velmi rozdílnými vlastnostmi zaměněných aminokyselin (Val239Ala, Ser369Phe, Gln531His, Leu128Phe, Phe835Leu). Sekvenovány byly také 3 kmene s SCV fenotypem, které se na rifampicinu jeví jako mutabilní – u jednoho z nich se vyskytovaly mutace v genu *mutS* vedoucí k záměnám Asn181His, Leu811Ser a Phe835Leu. Jeden z NCV kmenů rostoucích na rifampicinu jako silný hypermutátor nesl delecii v genu *mutS* a delecii v počátečním úseku genu *mutL*. Hypermutabilita by mohla být jedním z dalších vysvětlení zvýšené prevalence mutací v 23S rRNA a výskytu kmenů SCV v analyzovaném souboru, neboť bývá označována jako „hnací motor“ bakteriální adaptace ve stresujících podmínkách, jaké bezesporu panují také v dolních dýchacích cestách pacientů s CF.

7. SOUHRN

Na příkladu cystické fibrózy jsme komplexně charakterizovali velký a v České republice unikátní soubor stafylokoků coby původců chronických infekcí, které jsou často komplikovány rezistencí těchto bakterií k mnohým antibiotikům. V popředí našeho zájmu stála zejména MLS_B rezistence, která mezi izoláty *S. aureus* od českých pacientů s CF dosahovala vysoké prevalence 69 % (63 z 92 pacientů). Přibližně polovina MLS_B rezistentních izolátů kódovala klasické geny rezistence *ermA*, *ermC* nebo *msrA*, zatímco druhá polovina byla rezistentní díky různým mutacím v cílových místech působení této skupiny léčiv, konkrétně v konzervované oblasti domény V 23S rRNA (A2058G s různým počtem mutovaných kopií operonu *rrn*, A2058T, A2059G) a v genu pro ribozomální protein L4 (Thr70Pro, Gly69Ala, Gly71Ser). Poprvé byly v českém prostředí detekovány kmeny *S. aureus* nesoucí gen pro méně běžnou metylázu ErmT. U kmenů od 22 pacientů (24 %) se vyskytla MLS_B rezistence inducibilního charakteru, jejíž přehlédnutí může vést k selhání léčby a selekci konstitutivních mutantů *S. aureus*. Prevalence rezistence k ostatním antibiotikům byla poměrně nízká: 5% k oxacilinu, 14% ke kotrimoxazolu a 16% ke gentamicinu.

Klonální analýza na základě spa typizace a makrorestrikční analýzy pomocí PFGE prokázala vysokou heterogenitu testovaného souboru. S výjimkou klonálně se šířících kmenů MRSA (Rýnsko-hessenský klon nemocničního původu se spa typem t003) nebyla nalezena korelace mezi určitými spa typy či pulzotypy a profilem rezistence našich izolátů. Téměř u poloviny pacientů se jejich spa typ v průběhu sledovaného období změnil. V některých případech došlo k výměně infikujícího kmene, jindy se spa typ lišil pouze drobnými změnami, které spíše souvisí s adaptačními ději během chronické infekce. U několika pacientů byla patrná koexistence dvou odlišných klonů *S. aureus* s jejich střídavým záchytem.

V celém souboru jsme detekovali 21 tymidin-auxotrofních izolátů SCV *S. aureus* od 10 pacientů (11% prevalence v celém souboru), z nichž u 9 pacientů (90 %) byla detekována rezistence jejich izolátů ke kotrimoxazolu. Stejně vysoká byla také prevalence MLS_B rezistence mezi SCV kmeny (90 %), za kterou byly u 6 z 9 pacientů zodpovědné mutace, což naznačuje zvýšenou rezistenci a současně důležitou roli mutací u těchto snadno přehlédnutelných morfologických variant.

Naše předběžné výsledky naznačují, že přibližně 12 % pacientů (11 z 91 pacientů) nese kmeny *S. aureus* vykazující zvýšenou mutabilitu, přičemž u 3 pacientů by šlo dle našich kritérií o velmi silně hypermutátorové kmeny. U několika slabých a silných potenciálních hypermutátorů jsme detekovali mutace v genech *mutS* a *mutL*, které již byly v literatuře spojovány s hypermutátorovým fenotypem (např. Asn181His, Asn373Asp, Thr415Met, Leu811Ser), ale také

další nesynonymní mutace neznámého významu. U kmenů SCV *S. aureus* jsme však zvýšenou hypermutabilitu oproti kmenům NCV zatím neprokázali.

Na velkém souboru klinických vzorků *S. aureus* od pacientů s chronickou infekcí jsme poprvé v českém prostředí ukázali prevalenci příčin MLS_B rezistence včetně detekce mutací v 23S rRNA, dále proměnlivost klonality izolátů v průběhu infekce a především existenci jedinečných mechanismů, které *S. aureus* využívá pro usnadnění dlouhodobé perzistence v hostiteli, kdy může být výhodné „přepínat“ mezi jednotlivými morfologickými variantami a pohotově se adaptovat k měnícímu se prostředí DCD. Vedle preventivní azitromycinové léčby, podávané pacientům po dlouhou dobu v subterapeutických dávkách, by příčinou zvýšené prevalence mutací v 23S rRNA *S. aureus* v našem souboru mohla být rovněž hypermutabilita, označovaná jako „hnací motor“ bakteriální adaptace.

8. SEZNAM LITERATURY

- Alcalá-Franco B**, Montanari S, Cigana C, Bertoni G, Oliver A, Bragonzi A (2012) Antibiotic pressure compensates the biological cost associated with *Pseudomonas aeruginosa* hypermutable phenotypes in vitro and in a murine model of chronic airways infection. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67:962–969.
- Bdour S** (2012) Heterogeneity of aminoglycoside resistance genes profile in clinical *Staphylococcus aureus* isolates. *African Journal of Microbiology Research*, 6(24):5259-5265.
- Bergerová T**, Hedlová D, Jindrák V, Urbášková P, Chmelík V (2006) Doporučený postup pro kontrolu výskytu kmenů *Staphylococcus aureus* rezistentních k oxacilinu (MRSA) a s jinou nebezpečnou antibiotickou rezistencí ve zdravotnických zařízeních. *Zprávy Centra epidemiologie a mikrobiologie SZÚ*, 15(Supl. 1):1-11.
- Besier S**, Smaczny C, von Mallinckrodt C, Krahl A, Ackermann H, Brade V, Wichelhaus TA (2007) Prevalence and clinical significance of *Staphylococcus aureus* small-colony variants in cystic fibrosis lung disease. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(1):168-172.
- Besier S**, Zander J, Kahl BC, Kraiczky P, Brade V, Wichelhaus TA (2008) The Thymidine-Dependent Small-Colony-Variant Phenotype Is Associated with Hypermutability and Antibiotic Resistance in Clinical *Staphylococcus aureus* Isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(6):2183-2189.
- Biswas L**, Biswas R, Schlag M, Bertram R, Götz F (2009) Small-Colony Variant Selection as a Survival Strategy for *Staphylococcus aureus* in the Presence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(21):6910-6912.
- Boucher HW**, Talbot GH, Bradley JS, Edwards JE, Gilbert D, Rice LB, Scheld M, Spellberg B and Bartlett J (2009) Bad Bugs, No Drugs: No ESCAPE! An Update from the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases*, 48(1):1-12.
- Canu A**, Malbruny B, Coquemont M, Davies TA, Appelbaum PC, Leclercq R (2002) Diversity of ribosomal mutations conferring resistance to macrolides, clindamycin, streptogramin, and telithromycin in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(1):125-131.
- Caulder CR**, Bookstaver PB, Brown DE, Brown D (2013) Evaluation of linezolid and vancomycin in the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Cystic Fibrosis patients. *International Journal of Pharmacology and Toxicology*, 1(1):1-5.
- Conly JM, Johnston BL** (2002) VISA, hetero-VISA and VRSA: The end of the vancomycin era?. *The Canadian Journal of Infectious Diseases*, 13(5):282.
- Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry** (2012) Annual Data Report, Bethesda, Maryland.
- Dasenbrook EC**, Checkley W, Merlo CA, Konstan MW, Lechtzin N, Boyle MP (2010) Association between respiratory tract methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and survival in cystic fibrosis. *Journal of the American Medical Association*, 303(23):2386-2392.
- Döring G**, Flume P, Heijerman H, Elborn JS (2012) Treatment of lung infection in patients with cystic fibrosis: current and future strategies. *Journal of Cystic Fibrosis*, 11:461–479.
- Döring G, Gulbins E** (2009) Cystic fibrosis and innate immunity: how chloride channel mutations provoke lung disease. *Cellular Microbiology*, 11(2):208-216.
- Edwards AM** (2012) Phenotype switching is a natural consequence of *Staphylococcus aureus* replication. *Journal of Bacteriology*, 194(19):5404-5412.
- Fluit AC**, Wielders CL, Verhoef J, Schmitz FJ (2001) Epidemiology and susceptibility of 3,051 *Staphylococcus aureus* isolates from 25 university hospitals participating in the European SENTRY study. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(10):3727-3732.
- Gabashvili IS**, Gregory ST, Valle M, Grassucci R, Worbs M, Wahl MC, Dahlberg AE, Frank J (2001) The polypeptide tunnel system in the ribosome and its gating in erythromycin resistance mutants of L4 and L22. *Molecular cell*, 8(1):181-188.

- García LG**, Lemaire S, Kahl BC, Becker K, Proctor RA, Denis O, Tulkens PM, Van Bambeke F (2013) Antibiotic activity against small-colony variants of *Staphylococcus aureus*: review of in vitro, animal and clinical data. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 68:1455–1464.
- García-Álvarez L**, Holden MT, Lindsay H, Webb CR, Brown DF, Curran MD, Walpole E, Brooks K, Pickard DJ, Teale C, Parkhill J, Bentley SD, Edwards GF, Girvan EK, Kearns AM, Pichon B, Hill RL, Larsen AR, Skov RL, Peacock SJ, Maskell DJ, Holmes MA (2011) Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel *mecA* homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study. *Lancet Infectious Diseases*, 11:595-603.
- Garofalo A**, Gai C, Lattar S, Gardella N, Mollerach M, Kahl BC, Becker K, Prince AS, Sordelli DO, Gomez MI (2012) The length of the *Staphylococcus aureus* protein A polymorphic region regulates inflammation: impact on acute and chronic infection. *Journal of Infectious Diseases*, 206:81–90.
- Gregory ST**, Dahlberg AE (1999) Erythromycin resistance mutations in ribosomal proteins L22 and L4 perturb the higher order structure of 23 S ribosomal RNA. *Journal of Molecular Biology*, 289(4):827-834.
- Grundmann H**, Aanensen DM, Wijngaard CC van den, Spratt BG, Harmsen D, Friedrich AW, the European Staphylococcal Reference Laboratory Working Group (2010) Geographic Distribution of *Staphylococcus aureus* Causing Invasive Infections in Europe: A Molecular-Epidemiological Analysis. *Plos One*, 7(1):e1000215.
- Gutierrez O**, Juan C, Perez JL, Oliver A (2004) Lack of association between hypermutation and antibiotic resistance development in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from intensive care unit patients. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48:3573-3575.
- Hansen CR**, Pressler T, Hoiby N, Johansen HK (2009) Long-term, low-dose azithromycin treatment reduces the incidence but increases macrolide resistance in *Staphylococcus aureus* in Danish CF patients. *Journal of Cystic Fibrosis*, 8(1):58-62.
- Harmsen D**, Claus H, Witte W, Rothgänger J, Claus H, Turnwald D, Vogel U (2003) Typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a university hospital setting using a novel software for spa-repeat determination and database management. *Journal of Clinical Microbiology*, 41:5442-5448.
- Hauschild T**, Sacha P, Wiczorek P, Zalewska M, Kaczyńska K, Trynieszewska E (2008) Aminoglycosides resistance in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* from a University Hospital in Bialystok, Poland. *Folia Histochemica et Cytobiologica*, 46(2):225-228.
- Heijer CD**, van Bijnen EM, Paget WJ, Pringle M, Goossens H, Bruggeman CA, Schellevis FG, Stobberingh EE (2013) Prevalence and resistance of commensal *Staphylococcus aureus*, including methicillin-resistant *S aureus*, in nine European countries: a cross-sectional study. *Lancet Infectious Diseases*, 13(5):409-415.
- Hirschhausen N**, Block D, Bianconi I, Bragonzi A, Birtel J, Lee JC, Dübbbers A, Küster P, Kahl J, Peters G, Kahl BC (2013) Extended *Staphylococcus aureus* persistence in cystic fibrosis is associated with bacterial adaptation. *International Journal of Medical Microbiology*, 303(8):685-692.
- Hoboth C**, Hoffmann R, Eichner A, Henke C, Schmoldt S, Imhof A, Heesemann J, Hogardt M (2009) Dynamics of Adaptive Microevolution of Hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* during Chronic Pulmonary Infection in Patients with Cystic Fibrosis. *Journal of Infectious Diseases*, 200(1):118-130.
- Hoffman LR**, Deziel E, D'Argenio DA, Lepine F, Emerson J, McNamara S, Gibson RL, Ramsey BW, Miller SI (2006) Selection for *Staphylococcus aureus* small-colony variants due to growth in the presence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(52):19890-5.
- Hogardt M**, Hoboth C, Schmoldt S, Henke C, Bader L, Heesemann J (2007) Stage-Specific Adaptation of Hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* Isolates during Chronic Pulmonary Infection in Patients with Cystic Fibrosis. *Journal of Infectious Diseases*, 195(1):70-80.
- Horinouchi S, Weisblum B** (1980) Posttranscriptional modification of mRNA conformation: Mechanism that regulates erythromycin-induced resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 77(12):7079-7083.
- Chambers HF and DeLeo FR** (2009) Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. *Nature Reviews Microbiology*, 7:629-641.

- Chatterjee I**, Kriegeskorte A, Fischer A, Deiwick S, Theimann N, Proctor RA, Peters G, Herrmann M, Kahl BC (2008) *In vivo* mutations of thymidylate synthase (encoded by *thyA*) are responsible for thymidine dependency in clinical small-colony variants of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, 190:834-842.
- Chen J**, Yu Z, Michel FC, Wittum T, Morrison M (2007) Development and application of real-time PCR assays for quantification of *erm* genes conferring resistance to macrolides-lincosamides-streptogramin B in livestock manure and manure management systems. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(14):4407-4416.
- Cheung AL**, Bayer AS, Zhang G, Gresham H, Xiong YQ (2004) Regulation of virulence determinants *in vitro* and *in vivo* in *Staphylococcus aureus*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 40(1):1-9.
- Chung M**, de Lencastre H, Matthews P, Tomasz A, Adamsson I, Aires de Sousa M, Camou T, Cocuzza C, Corso A, Couto I, Dominguez A, Gniadkowski M, Goering R, Gomes A, Kikuchi K, Marchese A, Mato R, Melter O, Oliveira D, Palacio R, Sá-Leão R, Santos Sanches I, Song JH, Tassios PT, Villari P, Multilaboratory Project Collaborators (2000) Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by pulsed-field gel electrophoresis: comparison of results obtained in a multilaboratory effort using identical protocols and MRSA strains. *Microbial Drug Resistance*, 6(3):189-198.
- Chung WO**, Werckenthin C, Schwarz S, Roberts MC (1999) Host range of the *ermF* rRNA methylase gene in human and animal bacteria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 43:5-14.
- Kahl BC**, Herrmann M, Everding AS, Koch HG, Becker K, Harms E, Proctor RA, Peters G (1998) Persistent infection with small colony variant strains of *Staphylococcus aureus* in patients with cystic fibrosis. *Journal of Infectious Diseases*, 177(4):1023-1029.
- Kahl BC**, Duebbers A, Lubritz G, Haeberle J, Koch HG, Ritzfeld B, Reilly M, Harms E, Proctor RA, Herrmann M, Peters G (2003a) Population dynamics of persistent *Staphylococcus aureus* isolated from the airways of cystic fibrosis patients during a 6-year prospective study. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(9):4424-4427.
- Kahl BC**, Belling G, Reichelt R, Herrmann M, Proctor RA, Peters G (2003b) Thymidine-dependent small-colony variants of *Staphylococcus aureus* exhibit gross morphological and ultrastructural changes consistent with impaired cell separation. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(1):410-413.
- Kahl BC**, Mellmann A, Deiwick S, Peters G, Harmsen D (2005) Variation of the polymorphic region X of the protein A gene during persistent airway infection of cystic fibrosis patients reflects two independent mechanisms of genetic change in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology*, 43:502-505.
- Kahl BC** (2014). Small colony variants (SCVs) of *Staphylococcus aureus* – a bacterial survival strategy. *Infection, Genetics and Evolution*, 21:515-522.
- Kolpen M**, Hansen CR, Bjarnsholt T, Moser C, Christensen LD, van Gennip M, Ciofu O, Mandsberg L, Kharazmi A, Döring G, Givskov M, Høiby N, Jensen P (2010) Polymorphonuclear leucocytes consume oxygen in sputum from chronic *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia in cystic fibrosis. *Thorax*, 65(1):57-62.
- Kuroda M**, Ohta T, Uchiyama I, Baba T, Yuzawa H, Kobayashi I, Cui L, Oguchi A, Aoki K, Nagai Y, Lian J, Ito T, Kanamori M, Matsumaru H, Maruyama A, Murakami H, Hosoyama A, Mizutani-Ui Y, Takahashi NK, Sawano T, Inoue R, Kaito C, Sekimizu K, Hirakawa H, Kuhara S, Goto S, Yabuzaki J, Kanehisa M, Yamashita A, Oshima K, Furuya K, Yoshino C, Shiba T, Hiramatsu K (2001) Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *The Lancet*, 357(9264):1225-1240.
- Lai CJ**, Weisblum B (1971) Altered methylation of ribosomal RNA in an erythromycin-resistant strain of *Staphylococcus aureus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 68(4):856-860.
- LeClerc JE**, Li B, Payne WL, Cebula TA (1996) High mutation frequencies among *Escherichia coli* and *Salmonella* pathogens. *Science*, 274:1208–1211.
- Lina G**, Quaglia A, Reverdy ME, Leclercq R, Vandenesch F, Etienne J (1999) Distribution of genes encoding resistance to macrolides, lincosamides, and streptogramins among staphylococci. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43(5):1062-1066.
- Locke JB**, Hilgers M, Shaw KJ (2009) Novel Ribosomal Mutations in *Staphylococcus aureus* Strains Identified through Selection with the Oxazolidinones Linezolid and Torezolid (TR-700) *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53:12 5265-5274.

- Maciá MD**, Blanquer D, Togores B, Sauleda J, Pérez JL, Oliver A (2005) Hypermutation is a key factor in development of multiple-antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* strains causing chronic lung infections. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(8):3382-3386.
- Malbruny B**, Canu A, Bozdogan B, Fantin B, Zarrouk V, Dutka-Malen S, Feger C, Leclercq R (2002) Resistance to quinupristin-dalfopristin due to mutation of L22 ribosomal protein in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(7):2200-2207.
- Marra G, Schär P** (1999) Recognition of DNA alterations by the mismatch repair system. *Biochemical Journal*, 338(1):1-13.
- Matsuoka M**, Inoue M, Endo Y, Nakajima Y (2003) Characteristic expression of three genes, *msr(A)*, *mph(C)* and *erm(Y)*, that confer resistance to macrolide antibiotics on *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiology Letters*, 220(2):287-293.
- Melles DC**, Gorkink RF, Boelens HA, Snijders SV, Peeters JK, Moorhouse MJ, van der Spek PJ, van Leeuwen WB, Simons G, Verbrugh HA, van Belkum A (2004) Natural population dynamics and expansion of pathogenic clones of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Investigation*, 114:1732-1740.
- Melo-Cristino J**, Resina C, Manuel V, Lito L, Ramirez M (2013) First case of infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe. *The Lancet*, 382(9888):205.
- Melter O**, De Sousa MA, Urbášková P, Jakubů V, Žemličková H, De Lencastre H (2003) Update on the major clonal types of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the Czech Republic. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(11):4998-5005.
- Melter O, Radojevič B** (2010) Small colony variants of *Staphylococcus aureus* — review. *Folia Microbiologica*, 55(6):548-558.
- Melter O**, Urbaskova P, Jakubu V, Mackova B, Zemlickova H (2006) Emergence of EMRSA-15 clone in hospitals throughout the Czech Republic. *European Surveillance*, 11(31):3017.
- Mena A**, Maciá MD, Borrell N, Moya B, de Francisco T, Pérez JL, Oliver A (2007) Inactivation of the mismatch repair system in *Pseudomonas aeruginosa* attenuates virulence but favors persistence of oropharyngeal colonization in cystic fibrosis mice. *Journal of Bacteriology*, 189(9):3665-3668.
- Mena A**, Smith EE, Burns JL, Speert DP, Moskowitz SM, Perez JL, Oliver A (2008) Genetic adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to the airways of cystic fibrosis patients is catalyzed by hypermutation. *Journal of Bacteriology*, 190(24):7910-7917.
- Ministerstvo zdravotnictví ČR** (2012) *Věstník MZČR*, 4:5.
- O'Neill AJ, Chopra I** (2002) Insertional inactivation of *mutS* in *Staphylococcus aureus* reveals potential for elevated mutation frequencies, although the prevalence of mutators in clinical isolates is low. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 50:161-169.
- Oliver A**, Cantón R, Campo P, Baquero F, Blázquez J (2000) High frequency of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. *Science*, 288(5469):1251-1253.
- Oliver A, Mena A** (2010) Bacterial hypermutation in cystic fibrosis, not only for antibiotic resistance. *Clinical Microbiology and Infection*, 16(7):798-808.
- Pal C**, Maciá MD, Oliver A, Schachar I, Buckling A (2007) Coevolution with viruses drives the evolution of bacterial mutation rates. *Nature*, 450(7172):1079-1081.
- Popowska M**, Rzeczycka M, Miernik A, Krawczyk-Balska A, Walsh F, Duffy B (2012) Influence of soil use on prevalence of tetracycline, streptomycin, and erythromycin resistance and associated resistance genes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(3):1434-1443.
- Prunier AL**, Malbruny B, Tandé D, Picard B, Leclercq R (2002) Clinical isolates of *Staphylococcus aureus* with ribosomal mutations conferring resistance to macrolides. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(9):3054-3056.
- Prunier AL**, Malbruny B, Laurans M, Brouard J, Duhamel JF, Leclercq R (2003) High rate of macrolide resistance in *Staphylococcus aureus* strains from patients with cystic fibrosis reveals high proportions of hypermutable strains. *Journal of Infectious Diseases*, 187:1709-1716.

- Prunier AL**, Trong HNG, Tande D, Segond C, Leclercq R (2005) Mutation of L4 ribosomal protein conferring unusual macrolide resistance in two independent clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *Microbial Drug Resistance*, 11(1):18-20.
- Prunier AL, Leclercq R** (2005) Role of *mutS* and *mutL* genes in hypermutability and recombination in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, 187(10):3455-3464.
- Rachek LI**, Hines A, Tucker AM, Winkler HH, Wood DO (2000) Transformation of *Rickettsia prowazekii* to erythromycin resistance encoded by the *Escherichia coli ereB* gene. *Journal of Bacteriology*, 182(11):3289-3291.
- Rasmussen G**, Monecke S, Ehricht R, Söderquist B (2013) Prevalence of clonal complexes and virulence genes among commensal and invasive *Staphylococcus aureus* isolates in Sweden. *PLoS One*, 8(10):e77477.
- Ren CL**, Morgan WJ, Konstan MW, Schechter MS, Wagener JS, Fisher KA, Regelman WE, Investigators and Coordinators of the Epidemiologic Study of Cystic Fibrosis (2007) Presence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in respiratory cultures from cystic fibrosis patients is associated with lower lung function *Pediatric Pulmonology*, 42(6):513-8.
- Rice LB** (2008) Federal Funding for the Study of Antimicrobial Resistance in Nosocomial Pathogens: No ESKAPE. *Journal of Infectious Diseases*, 197(8):1079-1081.
- Roberts MC** (2008) Update on macrolide–lincosamide–streptogramin, ketolide, and oxazolidinone resistance genes. *FEMS Microbiology Letters*, 282(2):147-159.
- Robinson DA, Enright MC** (2003) Evolutionary Models of the Emergence of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 12:3926-3934.
- Rolo J**, Miragaia M, Turlej-Rogacka A, Empel J, Bouchami O, Faria NA, Tavares A, Hryniewicz W, Fluit AC, de Lencastre H, and the CONCORD Working Group (2012) High Genetic Diversity among Community-Associated *Staphylococcus aureus* in Europe: Results from a Multicenter Study. *PLoS One*, 7(4):e34768:1-10.
- Román F**, Canton R, Perez-Vazquez M, Baquero F, Campos F (2004) Dynamics of long-term colonization of respiratory tract by *Haemophilus influenzae* in cystic fibrosis patients shows a marked increase in hypermutable strains. *Journal of Clinical Microbiology*, 42:1450–1459.
- Román F**, Roldán C, Trincado P, Ballesteros C, Carazo C, Vindel A (2013) Detection of linezolid-resistant *Staphylococcus aureus* with 23S rRNA and novel L4 riboprotein mutations in a cystic fibrosis patient in Spain. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(5):2428-2429.
- Růžičková V**, Voller J, Pantůček R, Petráš P, Doškař J (2005) Multiplex PCR for detection of three exfoliative toxin serotype genes in *Staphylococcus aureus*. *Folia microbiologica*, 50(6):499-502.
- Sadowska B**, Bonar A, von Eiff C, Proctor RA, Chmiela M, Rudnicka W, Różalska B (2002) Characteristics of *Staphylococcus aureus*, isolated from airways of cystic fibrosis patients, and their small colony variants. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 32:191-197.
- Shaw KJ**, Rather PN, Hare RS, Miller GH (1993) Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. *Microbiological reviews*, 57(1), 138.
- Schmitz FJ**, Verhoef J, Fluit AC (1999) Prevalence of resistance to MLS antibiotics in 20 European university hospitals participating in the European SENTRY surveillance programme. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 43(6):783-792.
- Schmitz FJ**, Sadurski R, Kray A, Boos M, Geisel R, Köhrer K, Verhoef J, Fluit AC (2000) Prevalence of macrolide-resistance genes in *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecium* isolates from 24 European university hospitals. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 45(6):891-894.
- Schneider M**, Mühlemann K, Droz S, Couzinet S, Casaulta C, Zimmerli S (2008) Clinical characteristics associated with isolation of small-colony variants of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* from respiratory secretions of patients with cystic fibrosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(5):1832-1834.
- Schnellmann C**, Gerber V, Rossano A, Jaquier V, Panchaud Y, Doherr MG, Thomann A, Straub R, 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. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(12):4444-4454.

Schwendener S, Perreten V (2012) New MLSB resistance gene *erm(43)* in *Staphylococcus lentus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(9):4746-4752.

Smith EE, Buckley DG, Wu Z, Saenphimmachak C, Hoffman LR, D'Argenio DA, Miller SI, Ramsey BW, Speert DP, Moskowitz SM, Burns JL, Kaul R, Olson MV (2006) Genetic adaptation by *Pseudomonas aeruginosa* to the airways of cystic fibrosis patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(22):8487-8492.

Subramanian SL, Ramu H, Mankin AS (2012) Inducible resistance to macrolide antibiotics. *In: Dougherty TJ, Pucci MJ* (eds.): *Antibiotic Discovery and Development*, Springer Science & Business Media, LLC 2012:455-484.

Sutcliffe J, Grebe T, Tait-Kamradt A, Wondrack L (1996) Detection of erythromycin-resistant determinants by PCR. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 40(11):2562-2566.

Tait-Kamradt A, Davies T, Cronan M, Jacobs MR, Appelbaum PC, Sutcliffe J (2000) Mutations in 23S rRNA and ribosomal protein L4 account for resistance in pneumococcal strains selected in vitro by macrolide passage. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(8):2118-2125.

Tazi A, Chapron J, Touak G, Longo M, Hubert D, Collobert G, Dusser D, Poyart C, Morand PC (2013) Rapid Emergence of Resistance to Linezolid and Mutator Phenotypes in *Staphylococcus aureus* Isolates from an Adult Cystic Fibrosis Patient. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(10):5186-5188.

Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B (1995) Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *Journal of Clinical Microbiology*, 33(9):2233.

Thakar Y, Nagdeo N, Wanjari P (2014). Profile of antimicrobial resistance mechanisms in clinical isolates of *Staphylococci* with special reference to inducible clindamycin resistance. *Panacea Journal of Medical Sciences*, 4(1):65-69.

Tkadlec J, Melter O (2013) Small colony variants – *Staphylococcus aureus*. *Klinická mikrobiologie a infekční lékařství*, 19(3):96-102.

Tkadlec J, Vařeková E, Pantůček R, Doškař J, Růžičková V, Botka T, Fila L, Melter O (2015) Characterization of *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Czech Cystic Fibrosis Patients: High Rate of Ribosomal Mutation Conferring Resistance to MLS_B Antibiotics as a Result of Long-Term and Low-Dose Azithromycin Treatment. *Microbial Drug Resistance*, 21(4):416-423

Tuchscher L, Heitmann V, Hussain M, Viemann D, Roth J, von Eiff C, Peters G, Becker K, Löffler B (2010) *Staphylococcus aureus* small-colony variants are adapted phenotypes for intracellular persistence. *Journal of Infectious Diseases*, 202:1031–1040.

Tuchscher L, Medina E, Hussain M, Völker W, Heitmann V, Niemann S, Holzinger D, Roth J, Proctor RA, Becker K, Peters G, Löffler B (2011) *Staphylococcus aureus* phenotype switching: an effective bacterial strategy to escape host immune response and establish a chronic infection. *EMBO Molecular Medicine*, 3:129-141.

Urbášková P a Pracovní skupina pro monitorování antibiotické rezistence (2002) Stav citlivosti klinických izolátů stafylokoků, enterokoků a pneumokoků z 16 lokalit České republiky k antibiotikům včetně linezolidu. *Remedia*, 12:334–338.

Urbášková P, Marešová V, Jindrák V, Nyč O, Suchopár J, Sechser T, Hoza J, Karen I, Švihovec J (2003) Konsensus používání antibiotik II: Makrolidová antibiotika. *Praktický Lékař*, 83(10):563-571.

Urbášková P, Jakubů V, Macková B, Žemličková H (2007) Doporučený postup Národní referenční laboratoře pro antibiotika, SZÚ, revize 2014 (dostupné online <http://www.szu.cz/metody-nrl-pro-antibiotika>)

Urbášková P, Žemličková H, Hrabák J (2010) Jaké breakpointy používat pro interpretaci výsledků vyšetření citlivosti bakterií k antibiotikům? *Zprávy Epidemiologie a Mikrobiologie SZÚ*, 19(9):266-267.

Valenza G, Tappe D, Turnwald D, Frosch M, König C, Hebestreit H, Abele-Horna M (2008) Prevalence and antimicrobial susceptibility of microorganisms isolated from sputa of patients with cystic fibrosis. *Journal of Cystic Fibrosis*, 7(2):123-127.

- Vandendriessche S**, Kadlec K, Schwarz S, Denis O (2011) Methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* ST398-t571 harbouring the macrolide–lincosamide–streptogramin B resistance gene *erm(T)* in Belgian hospitals. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66(11):2455-2459.
- Vanhoof R**, Godard C, Content J, Nyssen HJ, Hannecart-Pokorni E (1994) Detection by polymerase chain reaction of genes encoding aminoglycoside-modifying enzymes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates of epidemic phage types. *Journal of Medical Microbiology*, 41(4):282-290.
- Vergison A**, Denis, Deplano A, Casimir G, Claeys G, DeBaets F, DeBoeck K, Douat N, Franckx F, Gigi J, Ieven M, Knoop C, Lebeque P, Lebrun F, Malfroot A, Paucquay F, Pierard D, Van Eldere J, Struelens MJ (2007) National survey of molecular epidemiology of *Staphylococcus aureus* colonization in Belgian cystic fibrosis patients. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59(5):8.
- Viviani L**, Zolin A, Olesen HV, van Rens J, Iansa P, Fox A, Prefititsi A, Pypops U, Mehta A, Ravilly S, Gulmans V, Contributing country managers and national representatives (2012) ECFSPR Annual Report 2008-2009.
- Wang S**, Wu C, Shen J, Wu Y, Wang Y (2013) Hypermutable *Staphylococcus aureus* strains present at high frequency in subclinical bovine mastitis isolates are associated with the development of antibiotic resistance. *Veterinary Microbiology*, 165(3-4):410-415.
- Wang Y**, Wang GR, Shoemaker NB, Whitehead TR, Salyers AA (2005) Distribution of the *ermG* gene among bacterial isolates from porcine intestinal contents. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(8):4930-4934.
- Wolter DJ**, Emerson JC, McNamara S, Buccat AM, Qin X, Cochrane E, Houston LS, Rogers GB, Marsh P, Prehar K, Pope CE, Blackledge M, Deziel E, Bruce KD, Ramsey BW, Gibson RL, Burns JL, Hoffman LR (2013). *Staphylococcus aureus* Small-Colony Variants Are Independently Associated With Worse Lung Disease In A Cohort Of Children With Cystic Fibrosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 187:A5278 (American Thoracic Society 2013 International Conference, May 17-22, 2013, Philadelphia Pennsylvania).
- Wunderink RG**, Niederman MS, Kollef MH, Shorr AF, Kunkel MJ, Baruch A, McGee WT, Reisman A, Chastre J (2012) Linezolid in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* nosocomial pneumonia: a randomized, controlled study. *Clinical Infectious Diseases*, 54(5):621-629.
- Yagci S**, Hascelik G, Dogru D, Ozcelik U, Sener B (2013) Prevalence and genetic diversity of *Staphylococcus aureus* small-colony variants in cystic fibrosis patients. *Clinical Microbiology and Infection*, 19(1):77-84.
- Zolin A**, McKone EF, van Rens J, Fox A, Iansa P, Prefititsi A, Pypops U, Gulmans V, Jung A, Mehta A, Viviani L, Olesen HV, Contributing country managers and national representatives (2014) ECFSPR Annual Report 2010.

9. PŘÍLOHY

Přílohy této diplomové práce jsou k dispozici v elektronické podobě na CD uloženém na vnitřní straně desek. Jedná se o tyto soubory:

SOUHRNNÁ TABULKA P1:

Soubor izolátů *S. aureus* od českých pacientů s CF (Ústav lékařské mikrobiologie 2. LF a FN Motol, 2011-2013)

ČLÁNEK PŘIJATÝ DO TISKU V PERIODIKU MICROBIAL DRUG RESISTANCE:

Tkadlec *et al.* (2015) Characterization of *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Czech Cystic Fibrosis Patients: High Rate of Ribosomal Mutation Conferring Resistance to MLS_B Antibiotics as a Result of Long-Term and Low-Dose Azithromycin Treatment.