

Svoluji k zapůjčení své diplomové práce ke studijním účelům a prosím, aby byla vedena přesná evidence vypůjčovateli. Převzaté údaje je vypůjčovatel povinen řádně ocitovat.

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Mikrobiologie



Bc. Jana Prášilová

Vznik a genetická podstata glykopeptidové rezistence u koaguláza-negativních stafylokoků

**Development and genetic basis of glycopeptide resistance in coagulase-negative
staphylococci**

Diplomová práce

Vedoucí práce/Školitel:

Mgr. Gabriela Balíková Novotná, Ph.D.

Praha, 2018

Prohlášení:

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

V Praze, 13. 08. 2018

Jana Prášilová

Poděkování:

Chtěla bych velmi poděkovat konzultantce a kamarádce Mgr. Leoně Zieglerové za ochotnou pomoc při práci v laboratoři, podporu a předané zkušenosti. Dále děkuji své školitelce Mgr. Gabriele Balíkové Novotné, PhD. za odbornou konzultaci a vedení mé diplomové práce. V neposlední řadě i Mgr. Vladimíru Vimbergovi, PhD., který mě při práci vždy podněcoval k zamyšlení nad danou problematikou, k samostatnému řešení vědeckého experimentu a poskytl mi cenné rady. Můj dík patří dále všem ostatním členům laboratoře: Mgr. Janě Veselé, Mgr. Jakubovi Lenártovi, Mgr. Markétě Koběrské, PhD., Mgr. Lídě Veselé za milý přístup a poskytnutou pomoc.

Velmi děkuji i svým rodičům, manželovi a dceři za trpělivost, shovívavost, podporu a poskytnutý čas na práci. Bez nich bych studium nejspíš nedokončila.

Abstrakt

Glykopeptidová antibiotika jsou tzv. antibiotika poslední volby, v klinické praxi využívaná k léčbě těžších, převážně nozokomiálních infekcí vyvolaných multirezistentními koaguláza-negativními stafylokoky. Vznik a genetická podstata rezistence ke glykopeptidovým antibiotikům nebyla u koaguláza-negativních stafylokoků doposud objasněna. Výzkumy prováděné u *Staphylococcus aureus* prokázaly, že střední rezistence ke glykopeptidovým antibiotikům je spojena s přítomností jedné či více mutací, spíše než by byla podmíněna nosičstvím konkrétního genetického elementu, jako je tomu u enterokoků.

Různými druhy selekce rezistentních mutant *in vitro* byly získávány izogenní páry glykopeptid citlivých a rezistentních kmenů *Staphylococcus epidermidis* a *Staphylococcus haemolyticus*. Analýzou sekvencí genomů těchto dvojic byly následně identifikovány jedno nukleotidové polymorfismy, které se nacházely převážně v systémech řídicích metabolismus a regulaci buněčné stěny. Fenotypová analýza neodhalila přímé spojení glykopeptidové rezistence se zvýšenou tvorbou biofilmu.

V klinické praxi je problematický vznik zkřížené rezistence glykopeptidových a jiných antibiotik. U neglykopeptidových antibiotik imipenemu a rifampicinu byl již dříve popsán výskyt zkřížené rezistence s glykopeptidovými antibiotiky u *S. aureus*. Selekcí rezistentních mutant inkubací ve zvyšujících se koncentracích imipenemu se neprokázal vznik zkřížené rezistence ke glykopeptidům u koaguláza-negativních stafylokoků. Naopak při vzniku glykopeptidové rezistence byla potvrzena selekce zkřížené rezistence k imipenemu u *S. haemolyticus*. Inkubací kmenů koaguláza-negativních stafylokoků se zvyšujícími se koncentracemi rifampicinu docházelo k selekci zkřížené rezistence k teikoplaninu, více než k vankomycinu.

Klíčová slova: koaguláza-negativní stafylokoky, selekce rezistentních mutant, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, glykopeptidová antibiotika, rezistence, imipenem, rifampicin, testování citlivosti, profil populační analýzy

Abstract

Glycopeptides are the so-called last-resort antibiotics in clinical practice used to treat heavier, predominantly nosocomial infections caused by multi-resistant coagulase-negative staphylococci. The origin and genetic basis of resistance to glycopeptide antibiotics has not yet been elucidated within coagulase-negative staphylococci. Research on *Staphylococcus aureus* has shown, that intermediate resistance to glycopeptide antibiotics is associated with the presence of one or more mutations, rather than being conditioned by the support of a particular genetic element, such as in enterococci.

By using various types of *in vitro* resistant mutant selection, we were able to obtain isogenic pairs of glycopeptide sensitive and resistant strains of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus haemolyticus*. By sequencing the genomes of these pairs, one nucleotide polymorphisms were identified and predominantly found in metabolic and cell wall control systems. Phenotypic analysis did not reveal a direct association of glycopeptide resistance with increased biofilm formation.

In clinical practice, the cross-resistance of glycopeptides and other antibiotics is problematic. For the non-glycopeptide antibiotics imipenem and rifampicin, the incidence of cross-resistance with glycopeptide antibiotics in *S. aureus* has previously been described. Selection of resistant mutants by incubation in increasing concentrations of imipenem did not show cross-resistance to glycopeptides in coagulase-negative staphylococci. Conversely, in the development of glycopeptide resistance, the selection of cross-resistance to imipenem in *S. haemolyticus* has been confirmed. Incubation of coagulase-negative staphylococci strains with increasing concentrations of rifampicin resulted in selection of cross-resistance to teicoplanin, more than vancomycin.

Key words: coagulase-negative staphylococci, selection of resistant mutants, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, glycopeptide antibiotics, resistance, imipenem, rifampicin, susceptibility testing, population analysis profile

Obsah

1	Úvod	9
2	Cíle práce.....	11
3	Přehled literatury	12
3.1	Charakterizace rodu <i>Staphylococcus</i>	12
3.2	Koaguláza-pozitivní stafylokoky: <i>Staphylococcus aureus</i>	13
3.3	Koaguláza-negativní stafylokoky.....	15
3.3.1	Identifikace.....	15
3.3.2	Populační struktura	15
3.3.3	Patogeneze.....	16
3.3.4	Rezistence k antimikrobiálním látkám	18
3.3.5	Klinicky významné druhy CoNS	19
3.4	Glykopeptidová antibiotika	22
3.4.1	Struktura vankomycinu a teikoplaninu	22
3.4.2	Semisyntetické glykopeptidy nové generace.....	24
3.4.3	Mechanismus účinku.....	26
3.5	Rezistence ke glykopeptidovým antibiotikům	29
3.5.1	Rezistentnce u enterokoků	29
3.5.2	Rezistence ke glykopeptidům u <i>S. aureus</i>	31
4	Materiál a metody.....	38
4.1	Materiál.....	38
4.1.1	Bakteriální kmeny.....	38
4.1.2	Vektory	39
4.1.3	Kultivační a jiná média	40
4.1.4	Roztoky a pufry	41
4.1.5	Oligonukleotidy a enzymy	42
4.1.6	Chemikálie.....	43
4.1.7	Komerční soupravy a standardy.....	44

4.1.8	Počítačová analýza	44
4.2	Metody	44
4.2.1	Kultivace a uchovávání bakterií.....	44
4.2.2	Testování citlivosti k antibiotikům	45
4.2.3	Selekce rezistentních mutant.....	49
4.2.4	Transformace	52
4.2.5	Izolace DNA	54
4.2.6	Polymerázová řetězová reakce (PCR).....	55
4.2.7	Elektroforetická separace molekul.....	56
4.2.8	Fenotypová analýza.....	56
5	Výsledky	59
5.1	<i>In vitro</i> selekce mutant <i>Staphylococcus epidermidis</i> rezistentních ke glykopeptidovým antibiotikům	59
5.1.1	Charakterizace sbírky <i>S. epidermidis</i> a výběr kmenů vhodných pro selekci rezistentních mutant	60
5.1.2	Frekvence vzniku rezistentních mutant <i>S. epidermidis</i> po jedнокrokové selekci na VAN a TEC	62
5.2	<i>In vitro</i> selekce mutant <i>Staphylococcus haemolyticus</i> rezistentních ke glykopeptidovým antibiotikům	64
5.2.1	Charakterizace sbírky <i>S. haemolyticus</i> a výběr kmenů pro selekci rezistentních mutant	65
5.2.2	Frekvence rezistentních mutant <i>S. haemolyticus</i> po jednoduché jedнокrokové selekci na vankomycinu	66
5.3	Porovnání účinnosti jedнокrokové a vícečrokové selekce	72
5.4	Studium vzniku zkřížené rezistence glykopeptidových a neglykopeptidových antibiotik	73
5.4.1	Vznik zkřížené rezistence ke glykopeptidům při selekci rezistence k imipenemu a rifampicinu	74
5.4.2	Vznik zkřížené rezistence k imipenemu při selekci rezistence k vankomycinu.....	77
5.5	Fenotypová analýza.....	79
5.5.1	Produkce biofilmu	79

5.5.2	Optimalizace protokolu na testování autolýzy	80
5.6	Vývoj systému na ověření mutací udílejících rezistenci ke glykopeptidovým antibiotikům..	81
5.6.1	Charakterizace a příprava systému na ověření mutací	81
5.6.2	Transformace mutované a nemutované varianty vraS do kmene <i>Staphylococcus aureus</i> NE823	82
5.6.3	Testování vlivu mutované a nemutované varianty VraS na citlivost k VAN a TEC.....	83
6	Diskuze	86
7	Souhrn	96
8	Seznam použité literatury	98

Seznam zkratek

Zkratka	Anglický název	Český překlad
ACME	Arginine Catabolite Mobile Element	
AUC	Area Under the Curve	oblast pod křivkou
CC	Clonal Complex	klonální komplex
CFU	Colony Forming Units	jednotky tvořící kolonie
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute	Institut klinických a laboratorních standardů
CoNS	Coagulase-Negative Staphylococci	koaguláza-negativní stafylokoky
CoPS	Coagulase-Positive Staphylococci	koaguláza-pozitivní stafylokoky
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing	Evropská komise pro testování citlivosti k antimikrobiálním látkám
FBRIs	Foreign Body Related Infections	infekce související s cizím tělesem
GISA	Glycopeptide Intermediate <i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i> středně rezistentní ke glykopeptidům
GlcNAc	N-acetylglucosamine	N-acetylglukosamin
HLR	High Level Resistance	vyšoká úroveň rezistence
hVISA	heterogenous VISA	heterogenní VISA
IS	Insertion Sequence	inzerční sekvence
MIC	Minimal Inhibitory Concentration	minimální inhibiční koncentrace
MLST	Multilocus Sequence Typing	
MRSA	Methicilin Resistant Staphylococcus aureus	metilicilin-rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>
MurNAc	N-acetylmuramic acid	N-acetylmuramová kyselina
NTML	Nebraska Transposon Mutant Library	Nebraská knihovna transpozonových mutantů
PAP	Population Analysis Profiling	profil populační analýzy
PBP2a	Penicilin Binding Protein 2a	penicilin vazebný protein 2a
PFGE	Pulsed Field Gel Electrophoresis	pulzní gelová elektroforéza
PIA	Polysaccharide Intracellular Adhesin	polysacharidový vnitrobuněčný adhezín
SCCmec	Staphylococcal Cassette Chromosome <i>mec</i>	stafylokoková chromozomální kazeta <i>mec</i>
SCV	Small Colony Variant	fenotyp malé kolonie
SNP	Single Nucleotide Polymorphism	jedno nukleotidový polymorfismus
ST	Sequence Type	sekvenční typ
VISA	Vancomycin Intermediate <i>S. aureus</i>	vankomycin středně rezistentní <i>S. aureus</i>
VRE	Vancomycin Resistant Enterococci	vankomycin rezistentní enterokoky
VRSA	Vancomycin Resistant <i>S. aureus</i>	vankomycin rezistentní <i>S. aureus</i>

1 Úvod

Nesprávně nastavená antibiotická politika, která zahrnuje nadužívání antibiotik, jejich předepisování na virové infekce, zbytečné užívání antibiotik s širokým spektrem účinku, místo přesně cílených přípravků, podporuje neustálý vývoj a šíření rezistentních kmenů bakterií. Častý je vznik multirezistentních kmenů, mezi něž patří zejména meticilin rezistentní *S. aureus* (MRSA), který je charakteristický svou rezistencí k oxacilinu a všem β -laktamovým antibiotikům. Kmeny MRSA jsou schopny velmi rychlého šíření, zejména v prostředí s vysokým selekčním tlakem antibiotik, proto jsou zařazeny mezi nozokomiální patogeny nejvyššího významu (Deurenberg a Stobberingh 2008). Výlučné zaměření na MRSA však odvádí pozornost od ostatních skupin neméně nebezpečných patogenů. Koaguláza-negativní stafylokoky se běžně vyskytují jako součást fyziologické lidské mikroflóry, avšak jako oportunní patogeny mohou u pacientů s oslabenou imunitou vyvolávat řadu infekcí. V porovnání se *S. aureus* sice neprodukuje faktory virulence, které by přímo poškozovaly hostitele, avšak jsou známy pro svou schopnost tvořit biofilm, a to zejména na cizích materiálech, jako jsou nemocniční katetry, kloubní náhrady či jiné implantáty (Otto 2004). Zásadním problémem u koaguláza negativních stafylokoků je vývoj multirezistentních kmenů, který je díky velké plasticitě jejich genomu rapidní (Cavanagh et al. 2014). Multirezistentní kmeny bývají často necitlivé na běžně dostupná antibiotika, proto je nutné při terapii infekcí vyvolaných těmito kmeny indikovat antibiotika „poslední volby“, jimiž jsou glykopeptidy.

Rezistence ke glykopeptidovým antibiotikům však není ojedinělá, a je nutné znát mechanismus i genetickou podstatu jejího vzniku, aby bylo možné jí předcházet. U *S. aureus* se glykopeptidová rezistence vyvíjí postupně v důsledku kumulace mutací převážně v systémech ovlivňujících metabolismus a regulaci buněčné stěny (Hu et al. 2016). Vznik rezistence ke glykopeptidům však u koaguláza-negativních stafylokoků zatím nebyl dostatečně studován a genetická podstata stále zůstává neznámá. Předchozí výsledky naší laboratoře ukazují, že fenotypové projevy glykopeptidové rezistence u koaguláza negativních stafylokoků jsou analogické s projevy u *S. aureus* (Vimberg et al. 2018a). I genetická podstata by mohla mít podobný charakter, avšak s možnými důležitými odchylkami, proto je třeba rezistenci u koaguláza-negativních stafylokoků studovat.

Diagnostika glykopeptidové rezistence je jak u *S. aureus*, tak u koaguláza-negativních stafylokoků značně obtížná, poněvadž není k dispozici žádný molekulární marker, který by umožnil rychlé a přesné určení těchto kmenů v klinické praxi. Využívá se pouze metod testování citlivosti, jako je diskový difúzní test či E-test, které jsou při určování glykopeptidové rezistence značně nespolehlivé a nepřesné. Profil populační analýzy je zlatým standardem testování citlivosti, poněvadž odhaluje i počínající rezistenci, avšak tato metoda se zdá být pro klinickou praxi nevhodná kvůli náročnosti provedení (Hafer et al. 2012). Zjištěním genetické podstaty rezistence by mohl být navržen i příslušný genetický marker, který by v budoucnu usnadnil klinickou identifikaci. Pro jednodušší charakterizaci jednotlivých mutací nalezených u glykopeptid-rezistentních koaguláza-negativních stafylokoků a určení jejich příspěvku k rezistenčnímu fenotypu, bylo jedním z cílů této práce zkonstruovat systém pro ověření mutací. Tento systém by byl založený na *S. aureus*, z důvodu znalosti již zavedených metod pro vnášení cizorodé DNA, které obcházejí restriktivně-modifikační systémy u *S. aureus* a jejich absence u koaguláza-negativních stafylokoků.

Vývoj glykopeptidové rezistence je spojen se selekčním tlakem glykopeptidových antibiotik. Ovšem ukázalo se, že nejen glykopeptidy stojí za vznikem této rezistence, ale i působení jiných antibiotik může selektovat rezistence ke glykopeptidům. U *S. aureus* například β -laktamové antibiotikum imipenem či rifamycinové antibiotikum rifampicin selektují jak *in vitro*, tak *in vivo* rezistenci ke glykopeptidům, což může značně komplikovat antibiotickou terapii (Katayama et al. 2009; Matsuo et al. 2011). U koaguláza-negativních stafylokoků vznik těchto zkřížených rezistencí zatím nebyl popsán, proto jsem se na toto téma zaměřila v diplomové práci.

Nejen MRSA, ale i koaguláza-negativní stafylokoky rezistentní ke glykopeptidům by měly být ve středu našeho zájmu, poněvadž jsou velkou potenciální hrozbou v klinické praxi, která nebyla doposud plně zhodnocena a brána na vědomí.

2 Cíle práce

Objasnění podstaty vzniku rezistence ke glykopeptidům u koaguláza-negativních stafylokoků

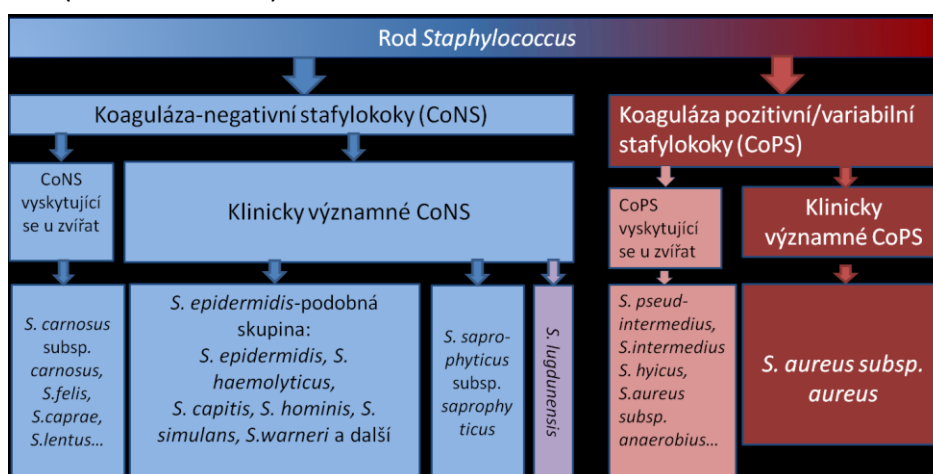
1. Selektovat mutantní kmeny *Staphylococcus epidermidis* a *Staphylococcus haemolyticus* rezistentní ke glykopeptidovým antibiotikům v laboratorních podmínkách a podrobit je fenotypové analýze
2. Popsat vznik zkřížené rezistence glykopeptidů s neglykopeptidovými antibiotiky (imipenem, rifampicin), u nichž bylo spojení se selekcí glykopeptidové rezistence prokázáno u *S. aureus*
3. Vyvinout systém založený na *S. aureus* pro ověřování mutací udílejících rezistenci ke glykopeptidům u koaguláza-negativních stafylokoků

3 Přehled literatury

3.1 Charakterizace rodu *Staphylococcus*

Bakterie rodu *Staphylococcus* jsou charakterizovány jako grampozitivní, kataláza pozitivní, nesporulující, nepohyblivé, neopouzdržené, fakultativně anaerobní mikroorganismy kokálního tvaru. Rod *Staphylococcus* patří do čeledi *Staphylococcaceae*, která dále zahrnuje např. rody *Macrococcus* a *Salinicoccus*. Čeleď *Staphylococcaceae* společně s čeleděmi *Bacillaceae*, *Listeriaceae* a dalšími patří do řádu *Bacillales* třídy *Bacilli*. Třída *Bacilli* je součástí kmene *Firmicutes*, který zahrnuje grampozitivní bakterie s nízkým obsahem GC párů v DNA (Becker et al. 2014).

Rod *Staphylococcus* se dělí na dvě skupiny: koaguláza pozitivní stafylokoky (CoPS), jejichž hlavním zástupcem je *Staphylococcus aureus* a koaguláza negativní stafylokoky (CoNS). Toto dělení zavedl roku 1940 R. W. Fairbrother, na základě schopnosti stafylokoků produkovat enzym koagulázu, srážející krevní plazmu. Jak již z názvu vyplývá, koaguláza pozitivní stafylokoky produkují koagulázu a tím pádem srážejí krevní plazmu a koaguláza negativní stafylokoky nikoli (Fairbrother 1940). CoNS jsou heterogenní skupinou, která nebyla vytvořena na základě fylogenetické příbuznosti. Rozdělení stafylokoků bylo významné především kvůli klinickému odlišení *S. aureus* od ostatních stafylokoků, dříve považovaných za méně patogenní. Do skupiny CoPS tedy řadíme z klinicky významných druhů téměř výhradně *S. aureus* subsp. *aureus*. CoNS významné v klinické praxi rozdělujeme na skupinu podobnou *S. epidermidis*, zahrnující druhy *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. capitis*, *S. hominis* a další, od níž oddělujeme druh *S. saprophyticus* subsp. *saprophyticus* a druh *S. lugdunensis* (viz obrázek č. 1).



Obr. 1 - Rozdělení rodu *Staphylococcus* se zdůrazněnými klinicky významnými skupinami, Upraveno podle Becker, Heilman and Peters, 2014

3.2 Koaguláza-positivní stafylokoky: *Staphylococcus aureus*

U této skupiny zastoupené druhem *S. aureus* uvedu jen základní charakteristiku a důležité milníky týkající se především antibiotické rezistence. V mé diplomové práci se zaměřuji na koaguláza-negativní stafylokoky, které však nejsou prozkoumány tak zevrubně, jako druh *S. aureus*. Proto v některých tématech budou získané poznatky porovnány s informacemi, které jsou dostupné pouze pro *S. aureus*.

S. aureus je významným nebezpečným lidským patogenem působícím řadu infekcí od mírných kožních infekcí, lehkých otrav z jídla, až po život ohrožující sepse, pneumonie, osteomyelitidy, infekční endokarditidy či syndrom toxického šoku (Lowy 1998).

Genom *S. aureus* je značně komplexní, poněvadž tento druh má neobyčejnou schopnost přijímat, ale i předávat genetickou informaci jak vertikálním, tak horizontálním přenosem. Příkladem je přenos ACME (Arginine Catabolic Mobile Element) ze *S. epidermidis* do vysoce invazivního multirezistentního komunitního izolátu *S. aureus* USA300, prokázáný celogenomovým sekvenováním tohoto kmene. ACME je genetický ostrov obsahující genový klastř kódující kompletní dráhu metabolizace L-argininu na CO₂, ATP a NH₄. Přijetí ACME tak zvýhodňuje USA300 v růstu a přežití v hostitelském organismu (Diep et al. 2006). Součástí přídavné genetické informace genomu bývají plazmidy, bakteriofágy, ostrovy patogenity, transpozony i inzerční sekvence. Geny kódující superantigeny jsou nečastěji duplicitní, což vysvětluje schopnost *S. aureus* kolonizovat širokou škálu hostitelů a překonávat bariéry imunity hostitele. Faktory patogenity zahrnují adheziny (specifické receptory proteinů extracelulární matrix hostitele), exoenzymy (enzymy umožňující invazivitu rozkládající organické složky lidských tkání), exotoxiny (významné superantigeny, např. toxin syndromu toxického šoku, různé druhy enterotoxinů) i další druhově specifické faktory (Kuroda et al. 2001).

S velkou plasticitou genomu souvisí i přijímání genů pro rezistenci k antibiotikům a jiným toxickým látkám nesených na plazminech a mobilních genetických elementech. V roce 1961, přesně 2 roky po zavedení antibiotika meticilinu do klinické praxe, byl nahlášen první výskyt meticilin rezistentního kmene *S. aureus* (MRSA), který vykazoval rezistenci ke všem β-laktamovým antibiotikům (penicilinům, cefalosporinům) (Jevons 1961). MRSA kmeny jsou v současnosti nejčastěji izolovanými nozokomiálními patogeny, vyvolávajícími lehčí onemocnění jako je impetigo, abscesy, folikulitidy, ale i závažnější případy nekrotizujících

pneumonií či infekčních endokarditid (Liu et al. 2011). Nejprve byly izolovány pouze MRSA kmeny s nemocničním původem, ale postupně se začaly objevovat i kmeny pocházející z komunitního prostředí a byl popsán i přenos MRSA ze zvířat na lidi (Stefani et al. 2012).

Meticilinová rezistence je podmíněna přijetím *mec* genu (*mecA*, *mecB*, *mecC*), který kóduje alternativní penicilin vazebný protein 2a (PBP2a), jenž udílí rezistenci díky jeho snížené afinitě k β -laktamovým antibiotikům. Varianty *mec* genů jsou nesený na SCC*mec* mobilním genetickém elementu (Staphylococcal Casette Chromosome *mec*). SCC*mec* je schopný se integrovat do bakteriálního chromozomu prostřednictvím místně specifických rekombináz kódovaných geny *ccrAB* a/nebo *ccrC* (Ito et al. 1999; Katayama et al. 2000). Doposud bylo identifikováno 11 typů SCC*mec* elementů a mnoho dalších subtypů, lišících se kombinací *ccr* a *mec* genů, které byly nalezeny po celém světě. Jejich správná identifikace může přispět k vhodné prevenci a cílené terapii (Liu et al. 2016). Velká většina klinických izolátů MRSA však patří ke globálně rozšířeným klonálními typům, které jsou adaptované na nemocniční podmínky a působí nozokomiální epidemie po celém světě. V USA a Evropě převládá klonální komplex (CC) 5 SCC*mec*IV, z Velké Británie se celosvětově šíří klon EMRSA-15 (CC22, SCC*mec*IV) a v severní Americe, Asii a Austrálii dominuje klon sekvenčního typu (ST) 239, SCC*mec*III (Stefani et al. 2012). Celogenomové sekvenování 193 klonálních izolátů odpovídajících sekvenčnímu typu 22 odhalilo evoluci vývoje rezistence u těchto kmenů, která má postupný charakter. Nejprve byla získána penicilinová rezistence podmíněná *blaZ* genem, neseném na transpozonu, kódujícím BlaZ β -laktamázu. Následně došlo k několika nezávislým přijetím a nahrazením různých SCC*mec* elementů v rámci chromozomu s finálním zakotvením SCC*mec*IV elementu. Fluorochinolonová rezistence vznikla nedlouho po zavedení těchto antibiotik do klinické praxe a stejně tomu bylo i u dalších skupin antibiotik (tetracyklinů, aminoglykosidů či oxazolidinonů). Tyto závěry jsou přímým důkazem vzniku rezistencí v důsledku silného selekčního tlaku vyvolaného užíváním antibiotik a klinickou praxí. To potvrzuje i několikanásobné získání a opětovná ztráta erytromycinové rezistence, která je podmíněna přijetím plazmidu s genem *ermC* kódujícím ribozomální metylázu. Tato studie také potvrdila předpoklad, že geografická distribuce rezistence je dána specifickou antibiotickou terapií v dané zemi (Holden et al. 2013).

Léčba MRSA infekcí je značně obtížná. Vzhledem k multirezistenci MRSA kmenů, které jsou často necitlivé na běžně užívané antimikrobiální látky, se staly glykopeptidy

antibiotiky poslední volby pro léčbu infekcí vyvolaných MRSA. Bakterie nedokázaly vyvinout rezistenci k těmto antibiotikům téměř 40 let, což skýtalo naději, že ke glykopeptidům nelze navodit rezistenci. To se ovšem záhy vyvrátilo, když byl v Japonsku izolován první kmen *S. aureus* se sníženou citlivostí k vankomycinu (Hiramatsu et al. 1997b, 1997a). O rezistenci ke glykopeptidům bude zevrubněji pojednáno dále v kapitole 3.5.

3.3 Koaguláza-negativní stafylokoky

3.3.1 Identifikace

Je známo 38 druhů CoNS a jeden druh *S. schleiferi* zahrnující jak koaguláza-negativní poddruh (*S. schleiferi* subsp. *schleiferi*), tak koaguláza-pozitivní poddruh (*S. schleiferi* subsp. *coagulans*). Klinicky nejvýznamnější druhy jsou *S. epidermidis* a *S. haemolyticus*. Frekvence výskytu druhů CoNS v klinických zařízeních jednotlivých států se velmi liší a rok od roku se mění. Zjevně také závisí na druhu použité identifikační metody (Piette a Verschraegen 2009). V běžné laboratorní praxi se využívají jak fenotypické, tak genotypické metody pro identifikace druhů. V roce 1975 Kloos a Schleifer vyvinuli metodu, která na základě 13 klíčových charakteristik, jako je hemolýza, koagulázová aktivita, redukce nitrátu a aerobní produkce kyselin z různých karbohydrátů, rutinně určí druh lidského CoNS (Kloos a Schleifer 1975). V současnosti používané fenotypické testy (např. ID 32 STAPH či VITEK 2 ID-GP) jsou založené na těchto charakteristických fenotypových znacích. Spolehlivější jsou však metody genotypické využívající sekvenaci 16S rRNA, *rpoB*, *tuf* a dalších genů (Heikens et al. 2005).

3.3.2 Populační struktura

Genomická diverzita v rámci CoNS je široká. Metody založené na sekvenaci konzervovaných genů (Multilocus Sequence Typing, MLST) a pulzní gelové elektroforéze (PFGE) prokázaly velkou genetickou variabilitu u CoNS. V rámci několika studií byly identifikovány různé klony meticilin rezistentních *S. epidermidis* a *S. haemolyticus*, které se celosvětově šíří nemocnicemi jako epidemické klonální linie. Tyto klonální linie se vyznačují výbornou schopností kolonizovat lidský organismus, napadat hostitelský imunitní systém a adaptovat se na nové podmínky prostřednictvím frekventovaných rekombinací (Miragaia et al. 2007; Cavanagh et al. 2014). Naproti tomu u komunitních izolátů *S. epidermidis*, odebraných od zdravých jedinců je popsána enormní genetická diverzita (Jamaluddin et al. 2008). CoNS tedy nejsou vysoce klonální organismy, jejich populace mají spíše epidemický charakter, kdy dochází k celosvětovému šíření klonálních linií, odvozených od úspěšných

klinických izolátů. Z nich se rapidně vyvíjejí nové kmeny frekventovaným přenosem a rekombinací mobilních genetických elementů jako je SCC*mec* (Miragaia et al. 2007).

3.3.3 Patogeneze

Koaguláza negativní stafylokoky byly dlouho považovány za nepatogenní organismy. V porovnání se *S. aureus* postrádají faktory virulence, které by přímo způsobovaly poškození hostitelskému organismu. Jsou ale schopny hostitele kolonizovat, přilnout na různé povrchy i dlouhodobě přetrvávat, přičemž strategie jednotlivých druhů, potažmo kmenů je různá. Díky rozvoji zdravotnictví dochází ke zvyšování věkového průměru i možností přežití předčasně narozených dětí a pacientů s oslabenou imunitou. CoNS využívají této situace a jsou v současnosti frekventovanou příčinou nozokomiálních infekcí. I když jsou pouze oportunními patogeny, mají nezanedbatelný vliv na zdraví a potažmo i životy hospitalizovaných pacientů.

3.3.3.1 Produkce biofilmu

V patogenezi se uplatňuje především schopnost tvorby biofilmu, který se často formuje na povrchu různých materiálů (Peters et al. 1982). Tvorba biofilmu začíná po průniku do hostitele, kdy se bakterie přichytí na povrch tkáně či abiotického materiálu, s využitím proteinových i neproteinových adhezínů. Množí se a dochází ke vzniku mnohvrstevných agregátů za pomoci intracelulární adheze. Posléze biofilm roste a získává trojdimenzionální strukturu, která obsahuje kanálky, jimiž proudí živiny a kyslík ke všem vrstvám biofilmu. Bakteriální agregáty jsou obaleny produkty bakterií, jako jsou teichoové kyseliny, proteiny, extracelulární DNA, produkty hostitelského organismu a zejména polysacharidy. Z aglomerátů poté disociují jednotlivé buňky či jejich shluky a jsou přenášeny krevním řečištěm do míst, kde se začne tvořit znovu nový biofilm (O'Toole et al. 2000). Výhodou produkce biofilmu je ochrana bakterií před imunitním systémem hostitele, kdy biofilm působí jako mechanická bariéra prostupu buněk imunitního systému. Stejně tak biofilm brání průniku některých antimikrobiálních látek, jejichž hodnoty MIC vůči bakteriím v biofilmu bývají významně vyšší. Antibakteriální látky mohou mít také sníženou účinnost díky fyziologické dormanci buněk biofilmu, které mají sníženou aktivitu buněčných procesů, jako je dělení či syntéza proteinů a DNA, což významně redukuje účinek mnohých dalších antibiotik (Stewart 2002). Biofilm také obsahuje perzistentní bunky, které mají posílenou toleranci k antibiotikům, zvýšené množství těchto buněk se vyskytuje zejména po vystavení buněk antimikrobiálním látkám, což bylo prokázáno u *S. epidermidis* (Shapiro et al. 2011).

Biofilm se tvoří jak na abiotických površích zdravotnického materiálu (katetry, implantáty atd.), tak na biotickém povrchu lidských tkání (výstelka močového měchýře, srdeční chlopně). *S. epidermidis* i ostatní CoNS jsou nejčastěji asociovány s infekcemi spojenými s produkcí biofilmu. Tyto infekce mají většinou chronický charakter a mohou mít endogenní původ, kdy je nákaza způsobena přenosem mikroorganismů z fyziologické flóry sliznic a kůže či původ exogenní, kdy dochází k nákaze z vnějšího prostředí (např. kontaminovaným chirurgickým nástrojem) (Mack et al. 2009). Jsou obtížně léčitelné, a pokud je infikován například implantát, je nutné jej chirurgicky odstranit. Nebezpečné jsou zejména bakteriémie u předčasně narozených dětí s nízkou porodní váhou, u nichž jsou CoNS identifikovány jako původci z více než 40% (van der Zwet et al. 2005; Mitt et al. 2014).

3.3.3.2 Pronikání do hostitelského organismu a adaptace fyziologie buněk

Další vlastností CoNS vedoucí k patogenitě, je jejich schopnost integrovat se a přetrvávat v hostitelských buňkách. *S. epidermidis* je schopný adherovat k lidským kostním buňkám (Khalil et al. 2007) či k buňkám endotelií (Hirschhausen et al. 2010) a následně se integrovat. Dokáže se tímto způsobem skrýt před imunitním systémem i antimikrobiálními látkami. S intracelulární perzistencí se pojí i termín „small colony variant“ (SCV). Tento pojem zahrnuje specifický fenotyp, kdy má buňka defekt v elektronovém transportním řetězci a sníženou produkci α -toxinu, je tedy schopen přetrvávat uvnitř endoteliálních buněk a způsobovat chronické a perzistentní infekce (Von Eiff et al. 1997). Charakteristické jsou výrazné změny v metabolismu určující morfotyp kolonií, vyznačující se pomalým růstem, malými koloniemi či redukovanou tvorbou pigmentu. SCV také vykazují sníženou citlivost k antimikrobiálním látkám a zvýšenou schopnost tvořit biofilm (von Eiff et al. 2006; Al Laham et al. 2007)

3.3.3.3 Faktory virulence

S lidským imunitním systémem interagují CoNS prostřednictvím faktorů virulence. Komponenty buněčné stěny (peptidoglykan a teichoové kyseliny) stimulují lidské monocyty k uvolňování cytokinů, což může vést až k sepsi (Mattsson et al. 1993). Dále se uplatňují faktory zapojené do tvorby biofilmu, jako jsou např. polysacharidový vnitrobuněčný adhezín (PIA) i další adheziny chránící *S. epidermidis* před fagocytózou (Schommer et al. 2011). CoNS produkují také některé agresivní faktory virulence, jako jsou cytotoxiny, které mají však nízký cytolytický potenciál (Cheung et al. 2010).

3.3.4 Rezistence k antimikrobiálním látkám

Plasticita genomu CoNS a jejich schopnost akumulovat geny rezistence k antimikrobiálním látkám, vede k čím dál častějšímu výskytu multirezistentních kmenů (Ehlers et al. 2018). Multirezistence znamená získaná odolnost ke třem a více agens z různých kategorií antimikrobiálních látek (Magiorakos et al. 2012). Její vznik je výrazně urychlen v nemocničním prostředí, kde se geny rychle přenáší vertikálním i horizontálním přenosem. Zejména pak mezi kmeny produkujícími biofilm, který představuje výhodné prostředí pro přenos (Águila-Arcos et al. 2017). Vznikají tak velmi odolné kmeny, které se rychle šíří jak v rámci jedné nemocnice, tak mezi různými nemocničními zařízeními a infekce jimi způsobené jsou velmi obtížně léčitelné (Widerström et al. 2006).

Zvyšování procentuálního zastoupení multirezistentních izolátů necitlivých, zejména na penicilin, oxacilin, ciprofloxacin, klindamycin, erytromycin a gentamicin, představuje významnou komplikaci ve volbě vhodné antibiotické terapie. Rezistence na meticilin je široce rozšířena mezi klinickými izoláty, její výskyt se globálně pohybuje mezi 75 - 90 % (Lyytikäinen et al. 1996; Cuevas et al. 2004). V současnosti glykopeptidová antibiotika slouží jako antibiotika poslední volby při léčbě stafylokokových infekcí, ovšem i k těmto látkám se postupně vyvíjí rezistence, o čemž bude pojednáno dále.

CoNS jsou významným rezervoárem genetických elementů, které se snadno přenáší i horizontálně. Nebezpečný je zejména přenos genů podmiňujících rezistenci z CoNS na více virulentní *Staphylococcus aureus*. Byl popsán např. přenos rezistenčního genu pro mupirocin (*mupA*), neseného na plazmidu, ze *S. haemolyticus* do *S. aureus* (Rossi et al. 2016) či mezidruhový horizontální přenos stafylokokové chromozomové kazety, nesoucí *mecA* gen, podmiňující rezistenci k meticilinu ze *S. epidermidis* do *S. aureus* (Bloemendaal et al. 2010).

3.3.5 Klinicky významné druhy CoNS

3.3.5.1 *Staphylococcus haemolyticus*

Ačkoli je *S. haemolyticus* hlavní součástí mikrobiomu lidské kůže, je zároveň druhým nejčastěji izolovaným CoNS z klinických vzorků, po *S. epidermidis*. Způsobuje převážně infekce krevního řečiště, jako jsou bakteriémie a sepsa či urogenitální infekce, a to nejčastěji u pacientů s oslabenou imunitou a předčasně narozených dětí. *S. haemolyticus* postrádá faktory virulence, které by přímo způsobovaly dané onemocnění, při vzniku infekce je problematická převážně zvýšená schopnost získu multirezistence vůči dostupným antimikrobiálním látkám (Froggatt et al. 1989) i tvorba biofilmu (Silva et al. 2013). Z CoNS je *S. haemolyticus* nejvíce rezistentním druhem, který se snadno adaptuje na podmínky života v hostiteli.

Genom *S. haemolyticus* vykazuje extrémní flexibilitu, ve které hraje důležitou roli především okolí *oriC* lokusu tzv. *oriC* environ. Je to downstream oblast od *oriC* nesoucí geny charakterizující jednotlivé druhy stafylokoků, umožňující jejich adaptaci a přežití v hostitelském organismu. *OriC* environ představuje rekombinační „hotspot“, ve kterém dochází k častým rekombinacím spojeným s horizontálním přenosem genů. Obsahuje stafylokokové chromozomální kazety, které přinášejí geny z prostředí i velké množství inzerční sekvencí (IS) a jiných rekombináz se schopností vyštěpit geny pro bakterii nevýhodné (Takeuchi et al. 2005). IS elementy jsou navíc schopné buď inaktivovat gen svou přímou integrací do jeho ORF, nebo jej aktivovat tím, že se integrují vedle genu a zprostředkují mu silný promotor (Mahillon a Chandler 1998). U *S. haemolyticus* přítomnost četných IS tedy přispívá ke schopnosti získávat antibiotickou rezistenci. Konkrétně byly v oblasti *oriC* environu kmene JCSC1435 *S. haemolyticus* identifikovány geny pro tvorbu pouzdrných polysacharidů s anti-fagocytózními účinky či *SCCmec* udílející rezistenci k meticilinu. Geny spojené s antibiotickou rezistencí mohou být lokalizovány i na integrovaných či volných plazmidech mimo *oriC* environ (Takeuchi et al. 2005).

S. haemolyticus byl prvním druhem, který získal rezistenci ke glykopeptidovým antibiotikům: teikoplaninu a vankomycinu (Froggatt et al. 1989). Je také stafylokokovým druhem vykazujícím nejvyšší minimální inhibiční koncentraci (MIC) k těmto antibiotikům. *S. haemolyticus* je schopný častých přeskupení chromozomu. Bylo prokázáno, že kmen JCSC1435 *S. haemolyticus* rezistentní k teikoplaninu či meticilinu postupným pasážováním

v médiu bez antibiotika tvoří mutanty citlivé k těmto antibiotikům. Se změnou minimální inhibiční koncentrace (MIC) se také pojí transformace metabolického profilu, které mohou způsobit problémy v druhové identifikaci *S. haemolyticus*. U některých klinických izolátů *S. haemolyticus* obsahuje *oriC* environ geny pro manitol-specifický fosfotransferázový systém (*mtID*, *mtIA*) umožňující fermentovat manitol, což je vlastnost, která odlišuje *S. aureus* a *S. saprophyticus* od ostatních stafylokokových druhů. Tyto geny jsou u *S. haemolyticus* přenášeny horizontálním přenosem a významně přispívají k přežití a adaptaci v hostitelském organismu (Takeuchi et al. 2005; Cavanagh et al. 2014)

Klonální diverzitou klinických izolátů *S. haemolyticus* se zabývala například studie Kornineko *et al.* Metodou MLST rozdělila 71 izolátů do 23 skupin podle sekvenčních typů a tyto skupiny zařadila do 3 hlavních klonálních komplexů. Z výsledků vyplývá, že 63 % izolátů spadalo do sekvenčních typů (ST17, ST1, ST5 a ST14), řadících se do jediného klonálního komplexu a všechny izoláty z tohoto klonálního komplexu byly multirezistentní (Kornienko et al. 2016). Cavanagh *et al.* zmapovali populační strukturu 134 klinických izolátů *S. haemolyticus* z různých lokalit pomocí genomového sekvenování. Na základě identifikovaných SNPs rozdělili izoláty do 7 kladů (A - G). Izoláty z kladů A a B patřily do sekvenčního typu 1 (ST1), klady C a D obsahovaly izoláty sekvenčních typů ST4 a ST13 a izoláty z kladů E, F a G vykazovaly vyšší diverzitu sekvenčních typů. Podstatné však je, že 77,7 % ze všech identifikovaných izolátů vykazovalo multirezistenci (Cavanagh et al. 2014). Z obou studií vyplývá, že multirezistentní klony, ačkoli pochází z jiných geografických lokalit či byly izolovány v jiném období, jsou relativně konzervované a tyto endemické klony se epidemicky šíří mezi nemocnicemi mezinárodně.

3.3.5.2 *Staphylococcus epidermidis*

Tento druh se fyziologicky vyskytuje na kůži a mukózních membránách lidí, potažmo i jiných savců. Nachází se převážně na mandlích, hlavě a v nose, a je nejčastěji izolovaným druhem z lidských epitelí. Jako součást fyziologické mikroflóry kůže se uplatňuje i při kompetici s potenciálně patogenními mikroorganismy, jako jsou např. *S. aureus* a streptokoky skupiny A (Cogen et al. 2010). *S. epidermidis* jako oportunní patogen způsobuje mnoho infekcí asociovaných s produkcí biofilmu, který se vytváří na nitrožilních katetrech, implantátech či jiném zdravotnickém zařízení. Společně se *S. aureus* zodpovídá za dvě třetiny infekcí spojených s cizím tělesem (FBRIs, Foreign Body Related Infections) (Oliveira et

al. 2018). *S. epidermidis* je důležitým modelovým organismem pro studium FBRI (Otto 2012). Mezi FBRI radíme převážně systémové, ale i lokální infekce, způsobené tvorbou biofilmu na implantovaných materiálech a následným šířením bakterií krevním řečištěm. Zahrnují různé druhy endokarditid, meningitid i bakteriemií a sepsí novorozenců či pacientů s oslabenou imunitou (Bartlett 2004).

S. epidermidis je schopný přizpůsobit se hostitelskému prostředí a chránit se před ostatními bakteriemi i antimikrobiálními látkami. V genomu tohoto druhu také nalezneme *oriC* environ, v němž bylo identifikováno mnoho genů zodpovědných za detoxifikaci (chránící bakterii před toxickými látkami), genů spojených s produkcí bakteriocinu, antibiotik (iturin A, surfaktin) či polyglutamátového pouzdra, chránícího *S. epidermidis* před antimikrobiálními látkami (Takeuchi et al. 2005).

S. epidermidis vykazuje vysokou míru klonální diverzity. V klinické studii Miragaia *et al.* rozdělili 216 klinických izolátů různého geografického původu pomocí metody MLST na 74 sekvenčních typů. Avšak 74 % izolátů patřilo do jediné genetické linie, klonálního komplexu 2. Tento klonální komplex zahrnuje i mezinárodně rozšířený sekvenční typ 2 (ST2), který byl identifikován u izolátů ze 13 různých zemí (Miragaia et al. 2007). Skupina ST2 obsahuje genetické determinanty, podmiňující multirezistentní fenotyp, regulační geny i *ica* geny (kódující PIA adheziny, účastníci se tvorby biofilmu), inkorporované v inzerčních sekvencích a transpozonech. Tato genetická výbava zvyšuje virulenci a invazivitu skupiny ST2, která je mezinárodně nejrozšířenější a nejčastěji izolovanou skupinou mezi klinickými vzorky (Lee et al. 2016). Vědecká skupina Mendes *et al.* se zaměřila na epidemiologii linezolid rezistentních klinických izolátů *S. epidermidis* vyskytujících se v nemocnicích USA. Ze 71 izolátů bylo pomocí MLST 16,9 % zařazeno do skupiny ST2 a 21,1 % patřilo k sekvenčnímu typu 5 (Mendes et al. 2012). K ST5 typu radíme i kmeny PG10 klonální skupiny, které byly nejčastěji detekovány v rámci sbírky z českých nemocnic (viz. kapitola 5.1.1), což naznačuje, že jde o celosvětově rozšířený, klinicky úspěšný sekvenční typ.

3.4 Glykopeptidová antibiotika

Glykopeptidy jsou důležitou skupinou antibiotik, která má velký význam v léčbě infekcí vyvolaných převážně multirezistentními kmeny stafylokoků i jiných grampozitivních bakterií. Jsou antibiotiky tzv. poslední volby při léčbě infekcí vyvolaných MRSA i multirezistentními kmeny CoNS. Zástupci glykopeptidů vankomycin a teikoplanin jsou antibiotika izolovaná z přírody a v klinické praxi se využívají již více než 30 let. Oproti tomu semisyntetické glykopeptidy televancin, oritavancin a dalbavancin nejsou v klinice zavedeny ani 10 let, zato mají zlepšené vlastnosti, jako je např. prodloužený poločas rozpadu.

3.4.1 Struktura vankomycinu a teikoplaninu

Vankomycin byl poprvé izolován v roce 1953 z aktinomycety *Amycolatopsis orientalis*. Zanedlouho po objevu byl schválen pro klinické užití jako účinné antimikrobiální agens proti infekcím způsobeným penicilin rezistentními stafylokoky. Stejně jako další glykopeptidové antibiotikum teikoplanin, který byl izolován až v 80. letech 20. století z *Actinoplanes teichomyceticus*, má úzké spektrum účinku, působící pouze na grampozitivní bakterie. Základem jejich struktury je tricyklické či tetracyklické heptapeptidové jádro, které je často modifikováno glykosylací, halogenací, methylovací nebo obohaceno postranními řetězci lipofilních mastných kyselin, viz obr. 2 a 3 (Butler et al. 2014).

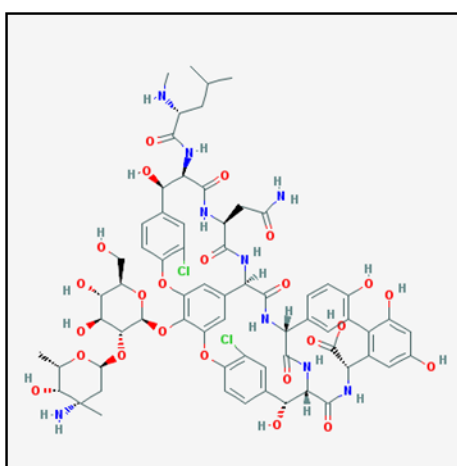
Vankomycin a teikoplanin jsou příbuzné přírodní látky s homologním heptapeptidovým jádrem s postranními řetězci, propojenými oxidačními vazbami. Peptidový řetězec vankomycinu tvoří sedm aminokyselin poskládaných následovně: 1. leucin, 2. β -hydroxytyrosin, 3. asparagin, 4. 4-hydroxyfenylglycin, 5. 4-hydroxyfenylglycin, 6. β -hydroxytyrosin, 7. 3,5-dihydroxyfenylglycin. Teikoplanin má lehce odlišné heptapeptidové jádro složené z aminokyselin v tomto pořadí: 1. 4-hydroxyfenylglycin, 2. β -hydroxytyrosin, 3. 3,5-dihydroxyfenylalanin, 4. 4-hydroxyfenylglycin, 5. 4-hydroxyfenylglycin, 6. β -hydroxytyrosin, 7. 3,5-dihydroxyfenylalanin. Elektron bohaté aromatické řetězce podmiňují počet oxidačních vazeb mezi zbytky a určují celkovou architekturu antibiotik. Tři oxidační vazby spojují aromatické řetězce u vankomycinu a čtyři u teikoplaninu, u kterého vznikající struktura připomíná tvarem kapsu. Heptapeptidová kostra je následně glykosylována, za vzniku glykopeptidu. V případě vankomycinu disacharidovým řetězcem (D-glukosyl-2,1-D-vankosamin) na zbytku 4 a u teikoplaninu třemi

monosacharidovými řetězci na zbytcích 4 (glukosamin), 6 (N-acetylglukosamin) a 7 (manóza) (Kahne et al. 2005).

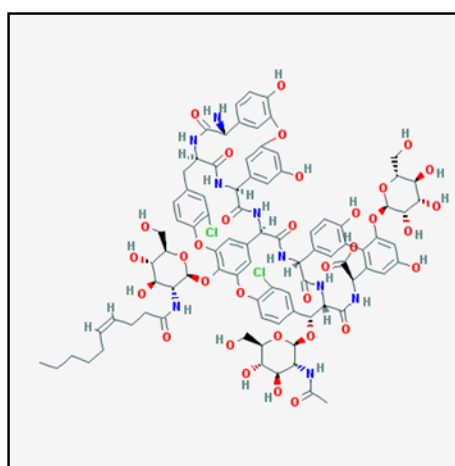
Podle substituentů na pozici 1 a 3 heptapeptidu, rozdělujeme přírodní glykopeptidová antibiotika do čtyř typů. Typ I, do kterého řadíme vankomycin, nese 1-valin a 3-asparagin/3-glutamin, tedy nearomatické aminokyseliny na pozicích 1 a 3. Nespojené aromatické zbytky mají glykopeptidy typu II (např. β -avoparcin, ristocetin). Aromatické zbytky spojené etherovou vazbou nesou na pozicích 1 a 3 glykopeptidová antibiotika typu III. Glykopeptidy Typu IV (např. teikoplanin) mají oproti typu III navíc lipofilní aryllovou či alkylovou skupinu připojenou k amino cukru (Nicolaou et al. 1999).

Glykopeptidy s mastnou kyselinou, jako například teikoplanin či semisyntetický televancin a dalbavancin, se nazývají lipoglykopeptidy. Mají pozměněné fyzikální vlastnosti a zvýšenou afinitu k membráně bakterií (Kahne et al. 2005).

Teikoplanin užívaný v klinické praxi je komplex, skládající se z pěti homologních lipoglykopeptidových molekul TA₂-1 až TA₂-5, které se liší pouze délkou a větvením řetězců mastných kyselin. Teikoplaninový komplex se nazývá také A₂ komplex podle hlavní komponenty TA₂-2 nesoucí 8-methylnonanovou kyselinu, viz obr. 2 (Barna et al. 1984). V porovnání s vankomycinem, který má poločas rozpadu v lidském těle pouze 3 - 5h, vykazuje teikoplanin delší poločas rozpadu (30 - 40h) (Hunt et al. 1984). Teikoplanin má



Obr. 2 - Teikoplaninový A₂ komplex,
zdroj: PubChem
(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/14969>)



Obr. 3 – Vankomycin, zdroj: PubChem
(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/16129710>)

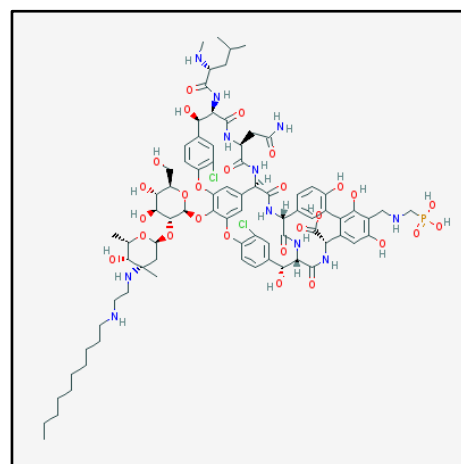
srovnatelnou efektivitu účinku jako vankomycin, ale oproti němu vykazuje nižší frekvenci vzniku nefrotoxicity a red man syndromu (Svetitsky et al. 2009). I díky těmto sníženým rizikovým faktorům je preferován při léčbě nemocí způsobených gram pozitivními bakteriemi u novorozenců (Pacifci 2016).

3.4.2 Semisyntetické glykopeptidy nové generace

V druhé polovině 20. století byly objeveny, kromě vankomycinu a teikoplaninu, i další v přírodě se vyskytující glykopeptidová antibiotika. Příkladem mohou být látky ristocetin či avoparcin. Po zavedení ristocetinu do klinické praxe v 90. letech se ukázalo, že jeho užívání je spojeno se závažnými vedlejšími účinky, takže nyní se ojediněle využívá pouze pro diagnostické účely. Avoparcin byl v Evropě až do poloviny 90. let komerčně využíván pouze jako růstový faktor pro hospodářská zvířata (Butler et al. 2014).

Vzhledem ke snižování citlivosti k dostupným glykopeptidům, bylo nutné vyvinout účinnější látky. Zde přichází na řadu glykopeptidy nové generace. Kvůli své strukturní komplexitě jsou nové glykopeptidové látky vyráběny především semisyntetickými modifikacemi přírodních produktů. Nejčastější úpravou je připojení hydrofobních řetězců, které zvyšují aktivitu nových antibiotik. Konkrétně podporují dimerizaci molekul antibiotika v roztoku, zesilují jejich vazbu na membránu a prodlužují poločas rozpadu glykopeptidů v lidském těle. K dalším výhodným vlastnostem může vést modifikace karbohydrátu glykopeptidu, která např. přispívá k depolarizaci membrány či přímo inhibuje transglykosylaci (Zhanel et al. 2010).

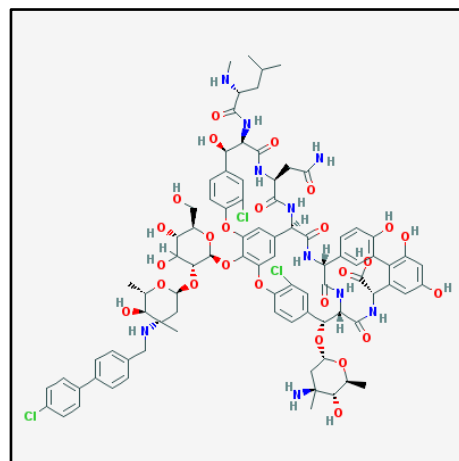
Jedním ze semisyntetických antibiotik je **telavancin** (viz obr. 4), derivát vankomycinu, který byl zaveden do klinické praxe v roce 2009. Oproti vankomycinu obsahuje navíc lipofilní substituent decylaminoethyl připojený na amino skupinu disacharidu D-glukosyl-2,1-Dvankosaminu a hydrofilní (fosfomethyl)aminomethylový substituent na C-terminálním dihydroxyfenylglycinovém zbytku heptapeptidu. Přítomnost jak hydrofilní, tak hydrofobní skupiny je výhodná. Zatímco lipofilní skupina podporuje



Obr. 4 – Telavancin, zdroj: PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3081362>)

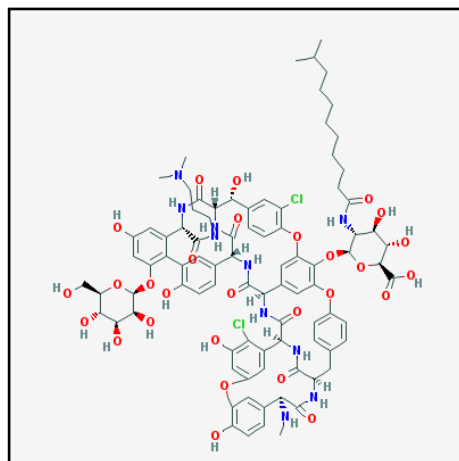
interakci antibiotika s membránou, hydrofilní skupina dokáže snížit celkovou lipofilitu antibiotika. Tím se zlepší distribuční vlastnosti, jako je nízký poločas rozpadu antibiotika a jeho nízká akumulace do tkání a zvýší se antimikrobiální účinek proti rezistentním organismům (Leadbetter et al. 2004).

Oritavancin (viz obr. 5) je N-alkyl-*p*-chlorofenyl-benzylový derivát chloroeremomycinu, přírodního glykopeptidu typu I. Modifikace cukerného zbytku chlorobifenylovou skupinou poskytuje nový mechanismus účinku tomuto glykopeptidu, který spočívá v depolarizaci bakteriální membrány a její následné zvýšené permeabilitě, vedoucí k buněčné smrti. K tomuto novému mechanismu si stále zachovává vlastnost inhibice biosyntézy buněčné stěny. Díky dvojitému mechanismu působení je efektivní i vůči vankomycin-rezistentním kmenům. Další výhodou je jeho vysoký poločas rozpadu blížící se v lidském těle ke 400h, umožňující jediné podání za celý léčebný cyklus (Belley et al. 2010). Pro užití v klinické praxi byl povolen od roku 2014.



Obr. 5 - Oritavancin, zdroj: PubChem, (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/16131319>)

Lipoglykopeptid **dalbavancin** (viz obr. 6) je odvozen od glykopeptidů typu IV. Amidací C-terminální karboxylové skupiny látky A40926, blízké příbuzné teikoplaninu, dimethylaminopropylaminovou skupinou vzniká dalbavancin. Oproti teikoplaninu i vankomycinu vykazuje zvýšenou *in vitro* aktivitu a významně prodloužený poločas rozpadu v lidském těle (na více než 200h). Je účinný proti gram pozitivním bakteriím rezistentním k vankomycinu i teikoplaninu, včetně multirezistentních *Staphylococcus aureus* (Bailey a Summers 2008). Do klinické praxe byl zaveden v roce 2014.



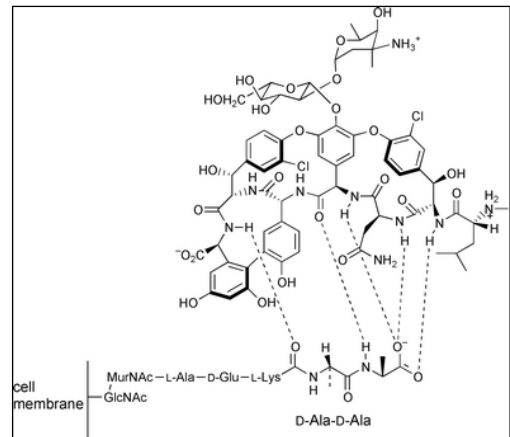
Obr. 6 - Dalbavancin, zdroj: PubChem, (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/122706694>)

3.4.3 Mechanismus účinku

Glykopeptidová antibiotika se řadí do skupiny antibiotik inhibující syntézu buněčné stěny. Působí pouze na grampozitivní bakterie, poněvadž vnější membrána gramnegativních bakterií představuje bariéru průchodu velkých molekul glykopeptidů. Glykopeptidová antibiotika cílí na syntézu peptidoglykanu, základní složku buněčné stěny bakterií. Peptidoglykan je rigidní polymer, skládající se z dlouhých řetězců střídajících se aminocukrů N-acetylglukosaminu (GlcNAc) a N-acetylmuramové kyseliny (MurNAc), propojených β -1,4-glykosidickou vazbou. Tyto řetězce jsou příčně spojeny krátkým peptidem, který je připojen na MurNAc. V případě grampozitivních bakterií je to pentapeptid, který se skládá z aminokyselin v následujícím pořadí: 1. L-alanin, 2. D-glutamová kyselina, 3. L-lysin, 4. D-alanin, 5. D-alanin.

Syntézu peptidoglykanu můžeme rozdělit do třech fází. První začíná v cytoplasmě, kde se syntetizují monomerní prekurzory cukerné kostry peptidoglykanu, UDP-GlcNAc a z něj derivovaný UDP-N-acetylmuramyl pentapeptid. Z těchto prekurzorů poté v druhé fázi vzniká pentapeptidový monomer (undekaprenyl-pyrophosphoryl-MurNAc pentapeptid), nazývaný také Lipid I, který je přenesen přes cytoplasmatickou membránu. Na něj je glykosyltransferázou připojen GlcNAc za tvorby Lipidu II (undekaprenyl-pyrophosphoryl-MurNAc-(pentapeptid)-GlcNAc), který je flipázou přenesen z vnitřní strany na vnější stranu cytoplasmatické membrány. Ve třetí fázi syntézy peptidoglykanu dochází k podélnému propojení molekul Lipidu II, tzv. transglykosylaci, katalyzované enzymem transglykosylázou. A následně dochází k příčnému propojení glykanových řetězců, tzv. transpeptidaci. Enzymy z rodiny transpeptidáz katalyzují propojení pentapeptidových řetězců za využití ϵ -NH₂ skupiny L-Lys na 3. pozici, která napadá D-Ala na 4. pozici pentapeptidu, čímž se uvolní D-Ala z 5. pozice. Vytvoří se kovalentní vazba propojující příčně glykanové řetězce, což poskytuje peptidoglykanu pevnost a mechanickou odolnost (Scheffers a Pinho 2005).

Heptapeptidová kostra glykopeptidů se váže pěti vodíkovými vazbami na C-terminální D-alanyl-D-alaninový dipeptid peptidoglykanového prekurzoru Lipidu II, čímž brání transpeptidační reakci. D-Ala-D-Ala dipeptid navázaný na antibiotikum tvoří stechiometrický komplex, který může stericky bránit i transglykosylační reakci. Nepropojené řetězce peptidoglykanu nejsou odolné, což vede k zeslabení buněčné stěny a zvýšení citlivosti bakteriální buňky k lyzi v důsledku působení osmotického tlaku (Reynolds 1989). Síla vazby mezi glykopeptidem a D-Ala-D-Ala motivem může být zvýšena dvěma mechanismy.



Obr. 7 – Vazba heptapeptidové kostry vankomycinu pěti vodíkovými vazbami na D-Ala-D-Ala dipeptid peptidoglykanového prekurzoru Lipidu II. Převzato z: <https://offset.peczuh.uconn.edu/wp-content/uploads/sites/240/2015/08/b100912-p-f2.gif>

- a) Tvorbou homodimerů molekul glykopeptidů, které se tvoří propojením glykopeptidových koster vodíkovými můstky. Vytvořené homodimery mohou mít kooperativní efekt, kdy jedna z molekul kotví a lokalizuje druhou molekulu antibiotika do cílového místa. Vytvoří se rigidní struktura, která zafixuje vazebné místo ve správné konformaci pro navázání ligandu (Beauregard et al. 1995). Platí to však jen pro některé glykopeptidy (vankomycin, oritavancin, eremomycin), poněvadž např. u dalbavancinu má dimerizace dokonce anti-kooperativní charakter při vazbě ligandu (Cheng et al. 2014).
- b) Další možností je přímé zakotvení antibiotika do membrány prostřednictvím lipidové kotvy, kterou je lipofilní struktura vyskytující ve struktuře u lipoglykopeptidů (teikoplanin, telavancin, tunicamycin). Lipidová kotva pomáhá udržet molekulu antibiotika blízko membrány, zvyšuje lokální koncentraci antibiotika, která může vést až k tvorbě pórů, narušení membránového potenciálu, vedoucí k depolarizaci membrány a zrychlené lyzi bakteriální buňky (Chmara et al. 1991; Higgins et al. 2005).

Přímá vazba na D-Ala-D-Ala dipeptid pravděpodobně není jediným mechanismem působení glykopeptidů. Ge et al. testovali vankomycinové deriváty obsahující chlorobifenylový substituent, a zároveň i tyto deriváty s poškozenou vazebnou kapsou pro

dipeptid, tedy neschopné vázat D-Ala-D-Ala. Zjistili, že i přes neschopnost vázat dipeptid, blokují transglykosylaci a vykazují antibakteriální aktivitu (Ge et al. 1999). Jedním z možných vysvětlení inhibice transglykosylace bez vazby na peptidoglykanový prekurzor je přímá interakce s transglykosylačním enzymem, ta však zatím prokázána nebyla (Goldman et al. 2000; Chen et al. 2003). Pravděpodobnější je, že takto modifikovaná antibiotika, např. oritavancin a příbuzné látky s chlorobifenylovým substituentem mají u *S. aureus* dvě vazebná místa, již známý D-alanyl-D-alaninový dipeptid peptidoglykanového prekurzoru a nově prokázané vazebné místo, nalezené nukleární magnetickou rezonancí, pentaglycinový můstek, na který se mohou vázat i za nepřítomnosti dipeptidu (Kim et al. 2008).

V nedávné době byl také odhalen nový mechanismus působení oritavancinu a jeho derivátů. Tato antibiotika v nízké subinhibiční koncentraci ($1/2$ MIC), kdy ještě nedochází k perforaci membrány, inhibují syntézu teichoových kyselin u *S. aureus*. Volný D-Ala je prioritně poskytován pro syntézu peptidoglykanu, čímž je znemožněna jeho inkorporace do teichoových kyselin a přerušuje se jejich biosyntéza. Inhibice syntézy teichoových kyselin není pro buňku smrtelná, ale vede ke změnám morfologie buňky, zvyšuje citlivost k antibiotikům a bakterie není schopná tvořit biofilm a kolonizovat hostitele. Kombinace inhibice syntézy teichoových kyselin a peptidoglykanu je zodpovědná za baktericidní aktivitu oritavancinu (Singh et al. 2017).

3.5 Rezistence ke glykopeptidovým antibiotikům

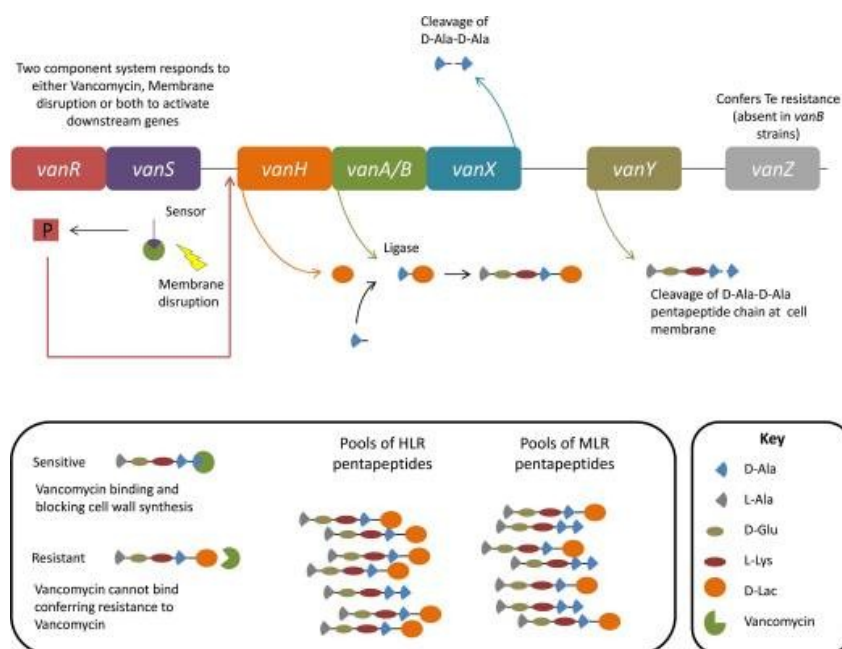
K léčbě infekcí způsobených grampozitivními bakteriemi se dříve využívala převážně β -laktamová antibiotika, poněvadž jsou oproti glykopeptidům lépe vstřebatelná a mají méně vedlejších účinků. Díky masivnímu nasazení β -laktamů v klinické praxi a nevhodné antibiotické politice se však záhy objevila rezistence k těmto antibiotikům. Ziegler *et al.* u různých kmenů *S. aureus* porovnávali vznik rezistence k penicilinu a vankomycinu, antibiotik, které inhibují třetí krok biosyntézy peptidoglykanu. Prokázalo se, že rezistence k vankomycinu je mnohem obtížněji navozena, než rezistence k penicilinu. Zatímco po dvaceti násobném pasážování buněk *S. aureus* v médiu obsahujícím antibiotikum narostla jejich minimální inhibiční koncentrace k penicilinu více než 100 000 krát, MIC k vankomycinu pouze 4-8 krát (McGuire, Wolfe a Ziegler, 1955). Vankomycin se tedy v 80. letech 20. století stal hlavním antibiotikem využívaným pro léčbu nemocí způsobených grampozitivními koky. Vědci předpokládali, že mikroorganismy nedokáží změnit cílové místo D-Ala-D-Ala glykopeptidů, poněvadž by musely cílit zároveň na více enzymů účastnících se peptidoglykanové syntézy. Ale již v roce 1986 se objevily vankomycin rezistentní kmeny enterokoků (VRE), které tuto hypotézu vyvrátily (Leclercq *et al.* 1988).

3.5.1 Rezistentnce u enterokoků

Časté užívání širokospektrých antibiotik, které redukuje přirozenou mikroflóru lidského střeva, podporuje selekci rezistentních subpopulací enterokoků, včetně vankomycin rezistentních kmenů. Až 30% izolátů enterokoků z USA je rezistentních na vankomycin a bakteriémie způsobené těmito kmeny neřídka vedou ke smrti pacientů. Nejvíce VRE řadíme ke druhům *Enterococcus faecium* (77 %) a *E. faecalis* (9 %) (Faron *et al.* 2016)

Enterokoky jsou přirozeně rezistentní k β -laktamovým antibiotikům, poněvadž konstitutivně produkují nízko afinitní penicilin vazebné proteiny (Fontana *et al.* 1985) a taktéž k aminoglykosidům, jejichž velká molekula nepronikne skrz buněčnou stěnu (Aslangul *et al.* 2006). Snadno získávají rezistenci i k jiným antibiotikům, např. tetracyklinům, chinolonům a glykopeptidům. Leavis *et al.* ukázali, že úspěšné šíření rezistentních subpopulací *Enterococcus faecium* v nemocnicích je podmíněno velkou plasticitou genomu získanou horizontálním přenosem mobilních elementů. Zejména inzerční sekvence, ale i fágové geny, plazmidy a geny podmiňující rezistenci k antibiotikům byly identifikovány u kladu, do kterého patří převážně rezistentní klinické izoláty *E. faecium* (Leavis *et al.* 2007).

Glykopeptidová rezistence je u enterokoků spojena s přítomností vankomycin rezistentního (Van) operonu, který může být inkorporován do chromozomu či nesen extrachromozomálně na plazmidu. Van operon se skládá ze 2 genů kódujících dvou komponentový regulační systém: *vanS-vanR* a minimálně 3 genů, kódujících enzymy: D-laktát dehydrogenázu – *vanH/vanT*, D-Ala-D-Ala dipeptidázu – *vanX* a variabilní ligázu, která může být kódována jedním z 9 genů (*vanA, vanB, vanC, vanD, vanE, vanG, vanL, vanM, vanN*). Exprese operonu je indukovaná dvou komponentovým systémem VanS/R. Receptorová transmembránová histidin kináza VanS přímo či nepřímo rozpozná navázaný glykopeptid, autofosforyluje se a následně předá PO₃ skupinu na N-terminální doménu regulátoru odpovědi VanR, jehož C-terminální doména působí jako transkripční regulátor, aktivující transkripci genů Van operonu kódujících enzymy. Tyto tři enzymy následně koordinovaně reprogramují peptidoglykanový dipeptid D-Ala-D-Ala na D-Ala-D-Lac, který zruší jednu vodíkovou vazbu mezi glykopeptidem a jeho cílovým místem, což vede k 1000 násobně snížené afinitě k vankomycinu. Alternativně se může vytvořit i D-Ala-D-Ser, způsobující konformační změny vedoucí ke snížené afinitě, ale ne tak výrazně jako D-Ala-D-Lac. VanH redukuje pyruvát na D-laktát, zatímco varianta VanT na D-Ser. VanA, B a D jsou ligázy tvořící D-Ala-D-Lac a VanC, E a G ligázy produkující D-Ala-D-Ser. VanX D-Ala-D-Ala dipeptidáza štěpící volný D-Ala-D-Ala dipeptid a VanY D,D-karboxypeptidáza odstraňuje koncový D-Ala pentapeptidového řetězce. D-Ala-D-Lac se akumuluje a je přidáván MurF ligázou na UDP muramyltripeptid, za tvorby UDP muramyl-L-Ala-D-γ-Glu-L-Lys-D-Ala-D-Lac, který má nízkou afinitu k vankomycinu. Obdobně se tvoří i pentapeptid s koncovým serinem, který má oproti předchozímu vyšší afinitu k vankomycinu (Van Bambeke et al. 2004; Kahne et al. 2005; Faron et al. 2016). Teikoplanin, vankomycin, telavancin i dalbavancin ztrácejí biologickou aktivitu u kmenů modifikujících koncový dipeptid na D-Ala-D-Lac, poněvadž mají velmi nízkou afinitu k tomuto substrátu (Treviño et al. 2014). Na druhou stranu oritavancin, který kromě dipeptidu cílí i na pentaglycinový můstek peptidoglykanu, je u těchto kmenů stále aktivní a mohl by být vhodnou alternativou pro léčbu infekcí způsobených VRE kmeny (Kim et al. 2008).



Obr. 8 - Schéma aktivace Van operonu za vzniku nízko-afinitního pentapeptidu s koncovým D-Ala-D-Lac. Rezistence vysoké úrovně (HLR) za přítomnosti nízko-afinitních pentapeptidů a rezistence střední úrovně (MLR) při kombinaci nízko a vysoko-afinitních pentapeptidů. Převzato z Faron, Lederboer and Buchanan, 2016

Úroveň glykopeptidové rezistence je závislá na variantě ligázového genu. Nejčastěji se vyskytují geny *vanA*, *vanB* a *vanC*. Přítomnost VanA ligázy podmiňuje vysokou úroveň rezistence (high level resistance, HLR) (MIC (VAN) > 256 µg/ml) a vyskytuje se převážně u *E. faecium* a *E. faecalis*. U HLR převažují nízko afinitní pentapeptidy s koncovým laktátem, viz obr. 8. Gen *vanA* společně s dalšími regulačními geny je lokalizován na transpozonu Tn1546 pocházejícího z *E. faecium* (Arthur et al. 1993). V operonu kmenů exprimujících VanA, je navíc gen *vanZ*, který přispívá k jejich současné rezistenci k teikoplaninu (Arthur et al. 1995). Kmeny nesoucí *vanB* jsou méně časté a způsobují variabilní rezistenci k vankomycinu, od nízké až po velmi vysokou (MIC, 4 až > 256 µg/ml). Přítomnost varianty *vanC*, převážně u kmenů *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* a *E. flavescens*, způsobuje rezistenci k vankomycinu nízké úrovně (MIC, 8 – 32 µg/ml) (O'Driscoll a Crank 2015).

3.5.2 Rezistence ke glykopeptidům u *S. aureus*

U koaguláza-negativních stafylokoků mechanismus ani genetická podstata vzniku rezistence ke glykopeptidům nebyly doposud objasněny. Glykopeptid heterorezistentní, či rezistentní kmeny CoNS vykazují podobný fenotypový projev jako heterogenně či středně rezistentní kmeny *S. aureus*, který se vyznačuje ztlustěním buněčné stěny či pozměněnou

autolýzou. To naznačuje, že by rezistence mohla mít podobný charakter jako u *S. aureus* (Nunes et al. 2006; Vimberg et al. 2018a).

3.5.2.1 Evoluce vývoje rezistentnce

V druhé polovině 20. století se celosvětově rozšířily meticilin rezistentní kmeny *S. aureus* (MRSA), které hrají roli i ve vývoji rezistence ke glykopeptidům. Důvodem je jejich schopnost inkorporovat i další geny pro rezistenci k jiným, než β -laktamovým antibiotikům do mobilních elementů *SCCmec*, za tvorby multirezistentních MRSA kmenů (Katayama et al. 2000; Hiramatsu et al. 2001). Pro léčbu těchto odolných kmenů, často citlivých pouze na vankomycin a teikoplanin, se ve velké míře začaly využívat glykopeptidy, převážně pak vankomycin. MRSA kmeny byly tímto vystaveny velkému selekčnímu tlaku (Ayliffe 1997). Nicméně glykopeptidová rezistence u stafylokoků se rozvíjela pomalu. První popsáný klinický izolát *S. aureus* (MRSA) se sníženou citlivostí k vankomycinu byl nahlášen v roce 1997 v Japonsku a měl středně zvýšenou minimální inhibiční koncentraci, pohybující se mezi 3 - 8 $\mu\text{g/ml}$ (za rezistentní se považuje kmen s $\text{MIC} > 2 \mu\text{g/ml}$) (Hiramatsu et al. 1997a). Poněvadž tyto izoláty vykazovaly střední rezistenci k vankomycinu, byly souhrnně nazvány vankomycin středně rezistentní kmeny *S. aureus* (Vancomycin-Intermediate *S. aureus*, VISA). Rezistence k teikoplaninu se objevila současně s popsáním vankomycin rezistentních izolátů, obdobně je tedy využíván i termín glykopeptid středně rezistentní kmeny *S. aureus* (Glycopeptide-Intermediate *S. aureus*, GISA). Obecně platí, že kmeny VISA vykazují sníženou citlivost k teikoplaninu (Hiramatsu 2001), zatímco snížená citlivost k teikoplaninu může i nemusí být spojena se současně sníženou citlivostí k vankomycinu (Kaatz et al. 1990).

Rozvoj rezistence k vankomycinu u VISA kmenů je postupný. Vzniku středně rezistentního kmene, zdá se, předchází heterogenní rezistence, což je stav, kdy různé subpopulace v rámci populace daného kmene vykazují rozdílnou citlivost k danému antibiotiku (El-Halfawy a Valvano 2015). I přesto, že jsou izoláty citlivé na daná antibiotika, může při léčbě infekcí jimi způsobenými selhávat antibiotická terapie. V klinické praxi je těžko identifikovatelná složitou metodou detekující profil populační analýzy (Population Analysis Profilig, PAP). Principem PAP metody je kultivace bakteriálního kmene na pevných půdách s přidavkem antibiotika o různých koncentracích (např. 0,5-16 $\mu\text{g/ml}$ pro VAN) a následné spočítání CFU/ml. Výsledné hodnoty jsou zaneseny do grafu se semi-logaritmickou škálou. Křivky se většinou porovnávají s kontrolními kmeny se známou citlivostí k daným

antibiotikům. Z každé misky se poté vybere několik kolonií, u nichž je změřena MIC, jejíž hodnota ovšem nemusí korelovat s heterorezistencí, poněvadž snížená citlivost subpopulace bakterií se při testování ne vždy projeví. Je totiž běžné, že daný heterorezistentní kmen dokáže růst na pevné půdě o vyšší koncentraci antibiotika, než je v důsledku jeho minimální inhibiční koncentrace (Benquan et al. 2002). Kmeny, jejichž MIC se pohybuje v citlivé škále, ale testování metodou PAP prokáže přítomnost rezistentních subpopulací, nazýváme heterogenní VISA (Heterogenous-VISA, hVISA) (Hiramatsu 2001). Oproti tomu vznik vankomycin-rezistentního *S. aureus* (VRSA), poprvé popsáno v USA v roce 2002, je způsoben konjugativním přenosem Van operonu z enterokoků (viz předchozí kapitola) (Weigel et al. 2003). Vzhledem k tomu, že do dnešní doby byly popsány jen desítky případů výskytu VRSA, nezdá se, že by rezistenční mechanismus spojený s přenosem Van operonu, byl u stafylokoků tak významný. Budu se tedy věnovat mechanismu vzniku rezistence u hVISA a VISA.

Klasifikace	<i>S. aureus</i> MIC VAN (mg/l)		Pozn.
	EUCAST	CLSI	
Citlivý (VSSA)	≤ 2	≤ 2	zahrnuje hVISA, ověření vyžaduje testování PAP
Středně-rezistentní (VISA)	-	4 - 8	EUCAST nedefinuje středně rezistentní kategorii
Rezistentní (VRSA)	≥ 4	≥ 16	

Tab. 1 - Klasifikace citlivosti *S. aureus* k vankomycinu. Minimální inhibiční koncentrace (MIC) testovaná mikrodiluční metodou. PAP, testování profilu populační analýzy; EUCAST, The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing; CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute.

3.5.2.2 Heterorezistence a střední rezistence k vankomycinu

Identifikace hVISA a VISA

Kategorie hVISA kmenů je v klinické praxi složitě identifikovatelná, poněvadž při testování MIC vykazují citlivost, ale subpopulace těchto kmenů jsou středně rezistentní až rezistentní. Tyto subpopulace jsou přítomny s frekvencí $\leq 10^{-5}$ – 10^{-6} a jejich detekce vyžaduje použití přesnější metody detekce PAP. Klinické izoláty *S. aureus* se sníženou citlivostí k vankomycinu popsané v Japonsku v roce 1997 se staly referenčními kmeny pro identifikaci VISA (Mu50) a hVISA (Mu3) (Wootton 2001). Je prokázáno, že z heterorezistentního kmene Mu3 s MIC rovnou 2 mg/ml a subpopulacemi s minimální inhibiční koncentrací dvakrát vyšší, se postupně vyvinul středně rezistentní Mu50, izolovaný ze stejného pacienta o 2 měsíce

později, s MIC k vankomycinu rovnou 8 mg/l (Hiramatsu et al. 1997a, 1997b). I jiné klinické případy potvrzují postupný vývoj kmenů VISA přes stádium hVISA, je tedy důležité identifikovat i heterogenní rezistenci u klinických izolátů (Hiramatsu 2001). Nejlépe reprodukovatelnou se zdá být modifikovaná PAP metoda podle Wootona, 2001. Ta spočívá ve 24h kultivaci kultury v TSB médiu, naředění na 10^{-3} a 10^{-6} a spirální vyšetí na BHI agar obsahující vankomycin o koncentracích: 0,5; 1; 2; 2,5; 4 mg/l. Kolonie se spočítají po 48 hodinách inkubace při 37°C a počet CFU je vyneseno proti koncentraci vankomycinu. Plocha pod křivkou (Area Under the Curve, AUC) je vypočtena a vydělena AUC kmene Mu3. Přítomnost hVISA je potvrzena, pokud je podíl $\geq 0,9$ (Wootton 2001). Zásadním problémem však je, že PAP metodu není kvůli časové náročnosti možné v klinické praxi provádět, proto heterorezistentní kmeny unikají identifikaci. Převážná většina VISA a hVISA kmenů se vyvine z klinických izolátů MRSA, ale i výskyt u komunitních izolátů MRSA i methicilin-citlivých kmenů byl potvrzen (Hawser et al. 2011).

Genetická podstata vzniku hVISA a VISA

Mechanismus vzniku střední a heterogenní rezistence k vankomycinu není jako u vzniku VRSA podmíněn získáním mobilních genetických elementů s rezistenčními geny. Je spojen s mutacemi, které se objevují v patogenním organismu *in vivo* během antibiotické terapie. Hlavním rizikem vývoje hVISA/VISA je vystavení daného bakteriálního kmene působení vankomycinu *in vivo*. Nicméně i jiná neglykopeptidová antibiotika mohou u *S. aureus* způsobit vznik hVISA. Účinek β -laktamového antibiotika imipenemu, působícího taktéž na syntézu buněčné stěny, vedlo k vývoji hVISA fenotypu *in vivo* (Katayama et al. 2009). Tento fenomén potvrzuje i retrospektivní studie, která identifikovala 38 hVISA kmenů, které byly izolovány ještě před zavedením glykopeptidů do klinické praxe. Selekčním tlakem, který způsobil vývoj heterorezistence bylo podle autorů působení antibiotika imipenemu (Yamakawa et al. 2012). Taktéž mutace spojené s rifampicinovou rezistencí mohou indukovat přeměnu hVISA na VISA (Matsuo et al. 2011). Tyto faktory nejsou specifické, což koreluje s předpokladem, že více různých mutací může u *S. aureus* způsobit stejný fenotyp. Sekvenování genomů hVISA/VISA kmenů a jejich citlivých rodičovských kmenů, odhalilo již různé druhy mutací, které se v důsledku manifestovaly jako podobný abnormální fenotyp (Gardete et al. 2012; Chen et al. 2014).

Fenotyp hVISA či VISA mohou vyvolat jak jednotlivé mutace (Cameron et al. 2012), tak soubor mutací, které podmiňují rezistenci (Chen et al. 2014). Vyskytují se přednostně v genech kódujících globální regulátory a částečně či úplně modifikují jejich vlastnosti. Nejčastěji jsou mutace nalézány v genech účastnících se regulace transkripce. Jsou to geny dvou komponentových systémů *walkR*, *vraRS* a *graRS*, či gen *rpoB* kódující podjednotku β RNA polymerázy (Cui et al. 2009; Matsuo et al. 2011; Shoji et al. 2011; Hafer et al. 2012). Mutace, které se vyskytují byť ve stejných genech, jsou velmi různorodé. Pokud se pokoušíme navodit vznik rezistentních kmenů selekcí na antibiotiku *in vitro*, to jest za laboratorních podmínek, mutace, které jsou v daném kmeni identifikovány, nejsou identické s mutacemi detekovanými u klinických izolátů izolovaných z pacientů, a dokonce se nemusí vyskytovat ani ve stejných genech (Vidaillac et al. 2013). Katayama *et al.* rekonstruovali VISA kmen z citlivého kmene *S. aureus in vitro* postupným zaváděním mutací, které byly identifikovány u VISA kmene Mu50. Pouze mutace ve *vraS* a *msrR* stačila ke snížení citlivosti k vankomycinu na úroveň hVISA. Další dvě mutace: v *graR* genu a v genu *rpoB* podmínily snížení citlivosti na úroveň VISA (Katayama et al. 2016).

Gardete et al., 2012 také prokázali, že rezistentní kmeny se bez přítomnosti selekčního tlaku, např. po dlouhodobém skladování, mohou revertovat zpět na citlivé. Udržování VISA fenotypu bakteriím snižuje fitness, tudíž mají tendenci navodit původní stav buď ztrátou mutace či novou kompenzační mutací (Gardete et al. 2012).

VraS histidinová kináza je součástí dvou komponentového systému VraSR, který slouží jako hlavní regulátor stimulonu buněčné stěny *S. aureus*. Stimulonem buněčné stěny se nazývá soubor genů, který reaguje na poškození buněčné stěny, např. inhibici syntézy. Zahrnují jak geny zapojené v samotné biosyntéze stěny, tak i jiné s nedefinovanou funkcí. VraSR působí jako „strážce“, který rozpozná narušení biosyntézy buněčné stěny a transkripčně aktivuje geny, které poškozenou buněčnou stěnu opraví (Kuroda et al. 2003; Utaida et al. 2003). I v dalších experimentech bylo prokázáno, že mutace inaktivující *vraSR* snižují rezistenci k vankomycinu a oxacilinu, což naznačuje, že pro některé linie *S. aureus* může být tato mutace společným mechanismem ztráty vankomycinové rezistence (Gardete et al. 2012).

V experimentu Gardete *et al.*, 2012 porovnávali tři isogenní kmeny *S. aureus* izolované z jednoho pacienta s určitým časovým odstupem během vankomycinové terapie. Byly to rodičovský kmen citlivý k vankomycinu (SG-S), následně derivovaný klinický MRSA klon se sníženou citlivostí k VAN (odpovídající VISA) označený SG-R a kmen, který opět získal citlivost k vankomycinu (SG-rev). V porovnání s rodičovským kmenem byly identifikovány u kmenů SG-R i SG-rev stejné mutace (*yycH*, *vraG*, *yvqF* a *lspA*). Avšak kmen SG-rev, který opětovně získal citlivost k VAN, nesl navíc pouze mutaci ve *vraS*. Vložení nemutovaného *yvqF* genu na plazmidu do SG-R kmene zapříčinilo ztrátu rezistence, zatímco vložení nemutovaného *vraSR* pak znovu způsobilo snížení rezistence na úroveň VISA. Sledováním transkripčního profilu také potvrdili, že v SG-R kmeni bylo rozdílně exprimováno více než 200 genů ovlivňujících transport, proteosyntézu, patogenezí, energetický metabolismus buňky či biosyntézu buněčné stěny. Zajímavé je, že došlo ke snížení exprese genů podmiňujících virulenci. Autoři studie předpokládají, že operon *orf1-yvqF-vraS-vraR* funguje jako tlačítko zapnuto/vypnuto. Mutace v *yvqF* zapíná *vraSR* systém, což vede k navození rezistence k vankomycinu u SG-R kmene a snížení exprese genů pro virulenci. Zatímco *vraS* mutace vypíná tento regulační systém za současného obnovení citlivosti k vankomycinu a normální exprese genů pro virulenci. Gardete *et al.* předpokládají, že snížená exprese genů pro virulenci, která je podmíněna regulací *orf1-yvqF-vraS-vraR* operonu, může být strategický manévr VISA kmenů, jak uniknout detekci hostitelským imunitním systémem (Gardete *et al.* 2012).

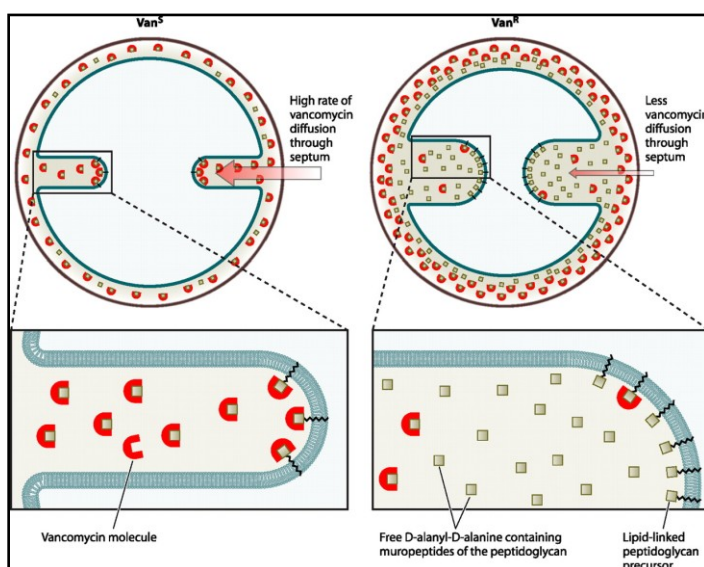
Inaktivace *VraSR* snižuje rezistenci k antibiotikům poškozujícím buněčnou stěnu, ale určité bodové mutace ve *vraS* přispívají také ke zvýšení rezistence k teikoplaninu či vankomycinu (Kato *et al.* 2008; Cui *et al.* 2009). Při studiu jednotlivých delečních mutant operonu *orf1-yvqF-vraS-vraR* se ukázalo, že v mutantním kmeni $\Delta YvqF$, stejně tak ve $\Delta VraR$ došlo k úplné represi indukce genů stimulonu buněčné stěny, což naznačuje, že proteiny *YvqF* a *VraR* působí jako aktivátory stimulonu buněčné stěny. Zároveň tyto mutanty vykazovaly plnou citlivost ke glykopeptidům. Deleční $\Delta vraS$ mutanty byly více citlivé ke glykopeptidům, než *VraS* kmeny divokého typu, ale pouze při nízkých koncentracích antibiotik. Mutanty navíc obsahovaly subpopulace buněk schopné růst na vyšších koncentracích glykopeptidů. Tyto výsledky mohou znamenat, že inaktivace *vraS* může taktéž zvyšovat toleranci ke glykopeptidům (McCallum *et al.* 2011).

3.5.2.2.1 Fenotypové projevy hVISA a VISA

K hlavním fenotypovým projevům hVISA a VISA patří modifikace buněčné stěny, která může být spojena s aktivací syntézy buněčné stěny (Hanaki 1998). Běžným indikátorem VISA při identifikaci elektronovým mikroskopem je ztlustění buněčné stěny. Pokud není ztlustění patrné již při mikroskopii bez přidání vankomycinu, po jeho dodání se zřetelně projeví. S postupným poklesem úrovně rezistence (např. při násobném pasážování v médiu bez antibiotika), se redukuje i tloušťka

buněčné stěny (Cui et al. 2003). Ztlustění buněčné stěny je univerzálním mechanismem vzniku rezistence u hVISA a VISA a spočívá v zabránění difúzi vankomycinu k jeho aktivnímu místu v cytoplasmatické membráně, konkrétně v oblasti nově

vznikajícího septa, při dělení buněk, viz obr. 9 (Sieradzki a Tomasz 2003). Zároveň u VISA izolátů pozorujeme v tomto místě navýšení počtu volných D-Ala-D-Ala dipeptidů (Pereira et al. 2007) a sníženou úroveň příčného propojení peptidoglykanových řetězců (Sieradzki a Tomasz 2003).



Obr. 9 – Fenotypový projev rezistence k vankomycinu – ztlustění buněčné stěny. Vlevo je vankomycin citlivá buňka (Van^S) s normální tloušťkou buněčné stěny, na detailu je vidět, že všechny koncové dipeptidy D-Ala-D-Ala peptidoglykanového prekurzoru jsou obsazeny molekulami VAN. Vpravo je vankomycin rezistentní buňka (Van^R) se ztlustěnou buněčnou stěnou, zvýšené množství dipeptidů D-Ala-D-Ala brání difúzi vankomycinu k jeho aktivnímu místu v dělicím septu buněk (detail vpravo dole). Převzato z Howden, 2010.

Dále se ve spojení s buněčnou stěnou objevuje nárůst produkce abnormálních muropeptidů či zvýšená exprese penicilin-vazebných proteinů 2 (Hanaki 1998) a snížená exprese penicilin-vazebných proteinů 4 (PBP4) (Finan et al. 2001). Kmeny se sníženou citlivostí také vykazují nižší růstovou rychlost a mají redukovanou citlivost k lysostafinu (Daum et al. 1992) a pozměněný charakter autolýzy (Boyle-Vavra et al. 2003).

4 Materiál a metody

4.1 Materiál

4.1.1 Bakteriální kmeny

Escherichia coli

- JM109 (Promega)

Kmen JM109 *E. coli* byl využit k transformaci a amplifikaci vektoru pRMC2 a konstruktů nesoucích geny *vraS_{Sh}* a *vraS_{ShQ289K}*.

Genotyp: *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 (r_K⁻, m_K⁺) supE44 relA1 Δ(lac-proAB) [F' traD36 proAB lac^fΔM15]*.

- IMO8B (Ian R. Monk)

Kmen IMO8B *E. coli* byl vytvořen z kmene DC10B (Monk et al. 2012) způsobem, který je popsán v článku (Monk et al. 2015). V této práci byl použit pro vytvoření správného metylačního vzoru pro přenos DNA ze *S. haemolyticus* do *S. aureus* prostřednictvím transformace. Konkrétně byly tyto buňky použity na transformaci vektoru pRMC2 a konstruktů pRMC2 nesoucích geny *vraS_{Sh}* a *vraS_{ShQ289K}*.

Genotyp: *mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL endA1 nupG Δdcm ΩPhelp-hsdMS (CC8-2) ΩPN25-hsdS (CC8-1)*

Staphylococcus aureus

- RN4220 (Focus Bio-Inova)

Kmen RN4220 byl použit pro expresi proteinů *VraS_{Sh}* a *VraS_{ShQ289K}* a pro sledování vlivu těchto proteinů na změnu citlivosti ke glykopeptidům.

- JE2 (NebraskaTransposon Mutant Library)

Kmen JE2 je odvozen od *S. aureus* USA300 LAC, meticilin rezistentního komunitního izolátu, u něž byl odstraněn plazmid nesoucí makrolidovou rezistenci (Fey et al. 2013).

- NE823 (NebraskaTransposon Mutant Library)

Kmen NE823 je odvozen od *S. aureus* JE2. Nese inserci transpozonu *bursa aurealis* v genu *vraS* (Bae et al. 2008) a gen pro rezistenci k erytromycinu.

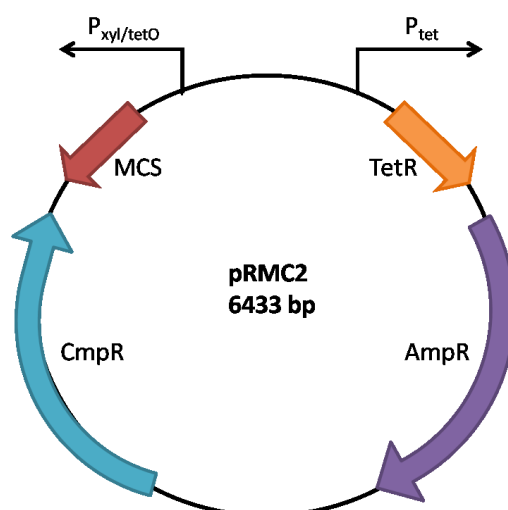
- ATCC29213 (ATCC)

Tento kmen byl využíván jako standard pro testování minimální inhibiční koncentrace. V této práci byl použit jako kontrolní kmen při testování mikrodiluční metodou.

4.1.2 Vektory

pRMC2 (6,433 kb; získáno od T. Foster)

Vektor (viz obr. 10) slouží pro kontrolování exprese genů ve *Staphylococcus aureus* a zároveň *E. coli*. Je to modifikovaný klonovací vektor pALC2073, který má mutovaný inducibilní $P_{xyl/tetO}$ promotor a obsahuje mnohonásobná klonovací místa. Promotor je aktivován tetracyklinem, v této práci byl použit netoxický homolog anhydrotetracyklin. Vektor pRMC2 nese dva geny pro ampicilinovou a chloramfenikolovou rezistenci, které slouží jako selekční markery (Corrigan a Foster 2009).



Obr. 10 – Vektor pRMC2: TetR – gen kódující rezistenci k tetracyklinu, AmpR – gen kódující rezistenci k ampicilinu, CmpR – gen kódující rezistenci k chloramfenikolu, MCS – mnohonásobné klonovací místo

4.1.3 Kultivační a jiná média

Uvedená média byla připravena v destilované vodě a sterilizována pomocí autoklávu při 121°C po dobu 15 minut, kromě média na uchovávání kompetentních buněk, které bylo sterilizováno filtrací.

B2 médium	
<i>složení</i>	$c_m[\text{g. dm}^{-3}]$
Kasein hydrolyzát	10
Kvasničný extrakt	25
NaCl	25
K ₂ HPO ₄	1
Glukóza (po sterilizaci)	5
pH = 7,5	

BHI médium	
<i>složení</i>	$c_m[\text{g. dm}^{-3}]$
Brain-heart infusion	37
pH = 7,5	

BHI agar	
<i>složení</i>	$c_m[\text{g. dm}^{-3}]$
Brain-heart infusion	37
Agar	15
pH = 7,5	

LB médium	
<i>složení</i>	$c_m[\text{g. dm}^{-3}]$
Trypton	10
Kvasničný extrakt	5
NaCl	5
pH = 7,5	

LB agar	
<i>složení</i>	$c_m[\text{g. dm}^{-3}]$
Trypton	10
Kvasničný extrakt	5
NaCl	5
Agar	15
pH = 7,5	

Médium pro uchovávání komp. buněk	
<i>složení</i>	$c_m[\text{g. dm}^{-3}]$
Polyethylenglykol (Mw=8000)	15 mM
Glycerol	36%
MgSO ₄	12 mM

MH agar	
<i>složení</i>	$c_m[\text{g. dm}^{-3}]$
Müller-Hinton Broth	10
Agar	15
pH = 7,5	

MH médium	
<i>složení</i>	$c_m[\text{g. dm}^{-3}]$
Müller-Hinton Broth	10
pH = 7,5	

TSB médium	
<i>složení</i>	$c_m[\text{g. dm}^{-3}]$
Tryptic Soy Broth	30
pH = 7,5	

4.1.4 Roztoky a pufrы

1x TAE pufr
<i>složení</i>
40 mM Tris-acetát 1mM EDTA
pH = 8, 0

Cell Lysis Müller pufr
<i>složení</i>
10 mM Tris-HCl 400 mM NaCl 2 mM EDTA
pH = 8, 0

TE⁻¹ pufr
<i>složení</i>
10 mM Tris-HCl 0,1 mM EDTA
pH = 8, 0

Fyziologický roztok	
<i>složení</i>	
NaCl	0,9%

TES pufr
<i>složení</i>
1 M Tris-HCl 0,5 M EDTA 25 g sacharózy (V = 100 ml)
pH = 8, 0

10x DNA vzorkový pufr
<i>složení</i>
50 mM EDTA 1% SDS 40% sacharóza 0,25% bromfenolová modř 10 mM Tris-HCl
pH = 8, 0

Pufr pro polymerázu
10x reakční pufr (Top-Bio)

Antibiotika

Zásobní roztoky antibiotik jsou 1000x koncentrované. Tyto roztoky se dále ředí, podle jejich rozpustnosti, na požadovanou koncentraci v daném experimentu.

Antibiotikum	Zásobní koncentrace (mg/ml)	Rozpustnost
Anhydrotetracyklin	0,1	Etanol
Erytromycin	10	Etanol
Chloramfenikol	25	Etanol
Imipenem	10	dH ₂ O
Rifampicin	10	Metanol
Teikoplanin	10	dH ₂ O
Vankomycin	10	dH ₂ O

Tab. 2 - Seznam využívaných antibiotik s uvedenou zásobní koncentrací a rozpustností

4.1.5 Oligonukleotidy a enzymy

Oligonukleotidy

Oligonukleotidy využívané k polymerázovým řetězovým reakcím byly navrženy Mgr. Gabrielou Balíkovou Novotnou, PhD. a Mgr. Leonou Zieglerovou. Syntetizovány byly firmou Sigma. Pracovní koncentrace 100 μ M byla získána naředěním oligonukleotidů destilovanou vodou.

Název oligonukleotidu	Oligonukleotid (5' - 3')	Navrhla
pRMC2 F	ACATTATATCATTGATAGAGTTATTTGTCAAAGTAG	Mgr. L. Zieglerová
pRMC2 R	ATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTG	Mgr. L. Zieglerová
BURSA erm R	AATATTGGAAGCTATATACGTAC	Mgr. G. B. Novotná, PhD.
NE823 R	ATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTG	Mgr. G. B. Novotná, PhD.

Tab. 3 - Výchet používaných oligonukleotidů a jejich aminokyselinová sekvence

Enzymy

- DNA polymeráza (Top Bio s.r.o.): Taq DNA polymeráza (5 U/ μ l)
- Ribonukleáza A (Sigma-Aldrich) – pracovní koncentrace 20 mg/ml (rozpuštná v octanu sodném)
- Lysozym (Sigma-Aldrich) – pracovní koncentrace 20 mg/ml (rozpuštný ve vodě)
- Lysostafin (Sigma-Aldrich) – pracovní koncentrace 1 mg/ml (rozpuštný v octanu sodném)

4.1.6 Chemikálie

Chemikálie	Výrobce	Zkratka/vzorec
Aceton	Lach:Ner	CH ₃ COCH ₃
Agar	Oxoid	
Agaróza	SeaKEM	
Anhydrotetracyklin hydrochlorid	Fluka	AnhyTet
Brain heart infusion	Oxoid	BHI
Bromfenolová modrá	Bio-Rad	C ₁₉ H ₁₀ Br ₄ O ₅ S
Deoxynukleotid trifosfáty	Promega	dNTPs mix
Dodecylsulfát sodný	Sigma	SDS
Erythromycin	Duchefa Biochemie	ERY
Ethanol	Fagron	EtOH
Ethidium bromid	Sigma	EtBr
Ethylendiamintetraacetát	Sigma	EDTA
Glukóza	Lach:Ner	C ₆ H ₁₂ O ₆
Glycerol	Lach:Ner	C ₃ H ₈ O ₃
Glycin	PENTA	Gly
Hydrogenfosforečnan draselný	AppliChem	K ₂ HPO ₄
Hydroxid sodný	Lach:Ner	NaOH
Chloramfenikol	Duchefa Biochemie	CM
Chlorid sodný	Lach:Ner	NaCl
Imipenem/cilastatin	Merck Sharp & Dohme B.V	IPM
Isopropanol	Lach:Ner	C ₃ H ₈ O
Kasein hydrolyzát	Fluka	
Kvasničný extrakt	OXOID	
Krystalová violeť	Lach:Ner	C ₂₄ H ₂₈ N ₃ Cl
Kyselina chlorovodíková	Lachema	HCl
Lysozym	Sigma	
Lysostafin	Sigma	
Methanol	Lach:Ner	CH ₃ OH
Müller Hinton Broth	Sigma	
Polyetylenglykol (Mw = 8000)	Sigma	PEG
Ribonukleáza A	Sigma	
Rifampicin	Duchefa Biochemie	RIF
Sacharóza	Lach:Ner	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁
Síran hořečnatý	AppliChem	MgSO ₄ (H ₂ O) ₇
Tris(hydroxymethyl)aminmethan	Sigma	TRIS
Trypton	OXOID	
Tryptic Soy Broth	Sigma	
Teikoplanin	Sigma	TEI
Vankomycin hydrochlorid	Sigma	VAN

4.1.7 Komerční soupravy a standardy

Izolace plazmidové DNA

- Wizard® Plus Midipreps DNA Purification System (Promega)

Standard molekulové hmotnosti u DNA agarózové elektroforézy

- 1 kb Plus DNA ladder (Invitrogen) – standard obsahuje fragmenty od 100 bp do 12 000 bp. Nanášíme-li 5 µl standardu, obsahuje fragment o velikosti 1650 bp 40 ng DNA, je tedy možné odečíst přibližnou koncentraci vzorků DNA.

Příprava: 100 µl 1 kb Plus DNA ladder; 100 µl 10x DNA vzorkový pufr; 800 µl TE⁻¹ pufr

4.1.8 Počítačová analýza

BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) – internetový program k vyhledávání oblastí lokální podobnosti mezi biologickými sekvencemi (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)

The Nebraska Transposon Mutant Library (NTML) Screening Array – internetový server sloužící jako nástroj pro vyhledávání kandidátních genů pro budoucí výzkum.

V NTML je k dispozici soubor 1920 kmenů, které nesou mutaci vždy v jednom z neesenciálních genů. Tato rozsáhlá sbírka umožňuje zkoumat mutace v konkrétních genech a jejich fenotypové projevy. (<https://app1.unmc.edu/fgx/tools.html>)

GenBank – anotovaná sbírka všech veřejně dostupných DNA sekvencí (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>)

4.2 Metody

4.2.1 Kultivace a uchování bakterií

E. coli, kmeny: JM109, IMO8B

Kmeny *E. coli* byly kultivovány jednak v LB médiu za stálého třepání 200 rpm při 37 °C 16 – 18 hodin, nebo na Petriho miskách obsahujících LB agar, při 37 °C 16 – 18 hodin. Pokud byly buňky podrobeny selekci s cílem identifikovat bakterie s vloženými plazmidy, přidávala se příslušná antibiotika. Pro dlouhodobé uchování buněk byly jednotlivé kolonie rozptýleny v 10% glycerolovém roztoku a uloženy v -80 °C.

Staphylococcus aureus, kmeny: RN4220, JE2, NE823

Kmeny *S. aureus* byly kultivovány jak v BHI médiu, při třepání 200 rpm, teplotě 37 °C, 16 - 18 hodin, tak na pevné půdě s BHI agarem, při 37°C 24 hodin. Ke kmeni NE823 byl přidáván erytromycin ve výsledné koncentraci 5 µg/ml a k buňkám s vloženými plazmidy bylo přidáváno selekční antibiotikum podle přítomného genu pro rezistenci. Bakteriální kmeny kultivované na pevných půdách byly krátkodobě uchovávány ve 4 °C, misky byly obalené parafilmem. Dlouhodobé uchování probíhalo při teplotě -80°C v 10% roztoku glycerolu.

4.2.2 Testování citlivosti k antibiotikům

Citlivost k antibiotikům je možné testovat buď kvalitativně, či kvantitativně. Při kvalitativním testování zjišťujeme pouze, zdali je daný bakteriální kmen citlivý či rezistentní k danému antibiotiku. Příkladem metody, která kvalitativně určuje citlivost, je diskový difúzní test. V této práci však byly v experimentální části využívány metody kvantitativního testování citlivosti, pomocí nichž byla zjišťována minimální inhibiční koncentraci (MIC), což je nejnižší koncentrace antibiotika, která viditelně potlačuje růst mikroorganismů. Mezi kvantitativní metody se řadí mikrodiluční metoda, agarová diluční metoda a E-test.

Mikrodiluční a agarová diluční metoda byly prováděny dle manuálu „Rezistence bakterií k antimikrobiálním látkám“ (Urbášková 1998). Metody byly navrženy tak, aby jejich výsledky byly reprodukovatelné. Standardizace kultivačních podmínek byla zajištěna přípravou zákalu inokula podle stupnice McFarland. Ve 2 ml fyziologického roztoku byl rozptýlen příslušný počet bakteriálních kolonií, narostlých 16 – 20 hodin při 37°C, tak, aby výsledný zákal McFarlanda byl rovní 0,5 (měřeno na densilometru).

4.2.2.1 Mikrodiluční metoda

Touto metodou byla nejčastěji zjišťována citlivost k antibiotikům u všech testovaných kmenů. Principem metody je vytvoření ředící řady antibiotika v MH médiu v jednotlivých sloupcích 96 jamkové mikrotitrační destičky, následném nanesení příslušného množství inokula daného kmene a sledováním růstu kmene po dvaceti čtyř hodinové kultivaci v termostatu při 37°C. Koncentrace, ve které již není patrný zákal narostlé kultury, je považována za MIC daného kmene. V jedné mikrotitrační destičce bylo možné testovat 12 kmenů v 8 různých koncentracích antibiotika (viz Tab. 4).

1. Do každé jamky mikrotitrační destičky bylo nepipetováno 100 μl MH média s příslušnou koncentrací antibiotika. V každém sloupci byla ředící řada 8 koncentrací, kdy rozpětí testovaných koncentrací se pro VAN a TEC pohybovalo konstantně mezi 0,5 – 32 (64) $\mu\text{l/ml}$, viz tabulka 4, avšak u IPM a RIF bylo rozmezí širší: 0,008 – 1024 $\mu\text{l/ml}$, podle charakteru daného kmene.
2. Po 5 μl inokula bylo napipetováno multikanálovou pipetou do všech 8 jamek. Mikrotitrační destička se následně zabalila do igelitu, aby se médium vlivem teploty neodpařovalo, a byla umístěna do termostatu (37°C) na 16 – 20 hodin.
3. Tvorba zákalu buněk byla posuzována buď na základě měření optické hustoty (OD_{600}) spektrofotometrem (BioTek Synergy HT). V tomto případě byla mikrotitrační destička po vyndání z termostatu ponechána 30 min při pokojové teplotě a následně bylo provedeno měření, aby nedocházelo k odpařování média do aparatury a chybnému měření. Nebo byl nárůst zákalu pozorován okometricky. Kontrolním kmenem byl *S. aureus* ATCC29213, který má známou citlivost k testovaným antibiotikům.

Zásobní koncentrace antibiotika (mg/ml)	ATB (μl)	dH ₂ O nebo metanol (μl)	Pracovní koncentrace ATB (mg/ml)	ATB (μl)	MH médium (μl)	Konečná koncentrace ATB ($\mu\text{l/ml}$)
10	x	x	10	2,56	800	32
10	x	x	10	1,28	800	16
10	10	90	1	6,4	800	8
10	10	90	1	3,2	800	4
10	10	90	1	1,6	800	2
1	10	90	0,1	8	800	1
1	10	90	0,1	4	800	0,5
x	x	x	x	0	800	0

Tab. 4 – Vzorová tabulka ředění antibiotik pro mikrodiluční metodu. Antibiotika byla rozpouštěna buď v destilované vodě (VAN, TEC, IPM), nebo v metanolu (RIF).

4.2.2.2 Agarová diluční metoda

Tato kvantitativní metoda testování citlivosti byla využívána pro úvodní testování MIC rodičovských kmenů *S. epidermidis*, které byly vybrány na selekci rezistentních mutant. Kapka inokula daného kmene se nanáší na agar o konkrétní koncentraci antibiotika a následně se zjišťuje první koncentrace ATB, na které kmen neroste, ta je považována za MIC.

1. Pracovní koncentrace antibiotik o objemu 2 ml byly připraveny podle tabulky č. 5 do sterilních zkumavek (50ml).
2. Za sterilních podmínek bylo k antibiotiku přidáno 18 ml MH agaru o teplotě cca 55 °C a vše bylo promícháno otáčením zkumavky a vylito do Petriho misky s průměrem 90 mm. Agarová půda se nechala ztuhnout a vysušit v laminárním boxu tak, aby na povrchu nedocházelo ke srážení kapek vody.
3. Byla připravena inokula jednotlivých bakteriálních kmenů a v zaznamenaném pořadí bylo 200 µl každého kmene přeneseno do jamky mikrotitrační destičky.

Zásobní koncentrace antibiotika (mg/l)	Objem ATB (ml)	Objem dH ₂ O (ml)	Pracovní koncentrace ATB (mg/ml)	Agar (ml)	Konečná koncentrace ATB (µl/ml)
1000	1,6	3,4	320	18	32
1000	0,8	4,2	160	18	16
1000	0,4	4,6	80	18	8
1000	0,2	4,8	40	18	4
100	1	4	20	18	2
100	0,5	4,5	10	18	1
10	2,5	2,5	5	18	0,5
x	x	x	x	18	0

Tab. 5 – Vzorová tabulka ředění antibiotik pro agarovou diluční metodu. Antibiotika byla rozpouštěna v destilované vodě: VAN, TEC.

4. Z mikrotitrační destičky bylo vždy 5 μ l inokula přeneseno multikanálovou pipetou na povrch agaru takovým způsobem, aby se špička pipety nedotkla plotny. Nejprve byly kmeny nanесeny na agar bez přídavku antibiotika a poté na plotny se zvyšující se koncentrací ATB.
5. Půdy byly následně vysušeny v laminárním boxu a posléze přeneseny do termostatu, kde probíhala kultivace při 37°C po dobu 24 hodin, poté byly vyhodnoceny MIC všech testovaných kmenů.

4.2.2.3 E-test

Metodou E-test byla prověřována MIC k vankomycinu a teikoplaninu u kmenů JE2, RN4220 a NE823 *S. aureus*, které nesly plazmid pRMC2 s geny kódujícími nemutovanou variantu: VraS_{Sh} či mutovanou variantu: VraS_{ShQ289K} proteinu VraS. E-test byl prováděn dle návodu firmy bioMérieux, od které byly proužky s antibiotiky zakoupeny. Principem metody je aplikace proužku E-testu s vytvořeným gradientem daného antibiotika na misku s pevnou agarovou půdou převrstvenou inokulem bakteriálního kmene. Po 16 – 20 hodinách inkubace při 37°C se odečítá MIC k danému antibiotiku podle toho, kterou koncentraci protíná zóna inhibice růstu kultury na proužku E-testu.

1. Krabičky s proužky E-testu byly 30 min před začátkem testování vyndány z mrazáku, kde byly uchovávány při -20°C, aby dosáhly pokojové teploty.
2. Mezitím bylo na misky o průměru 90 mm nalito 20 ml MH agaru vytemperovaného na 55°C a půda byla ponechána v laminárním boxu k úplnému proschnutí.
3. Inokulum o zákalu 1 McFarlanda bylo připraveno rozptýlením několika kolonií přes noc narostlé kultury bakteriálního kmene ve zkumavce se 2 ml fyziologického roztoku. Inokulum muselo být nanесeno na agarové plotny do 15 minut od jeho přípravy.
4. Nanášení inokula bylo provedeno přelitím povrchu agaru 1 ml inokula tak, aby se inokulum rozprostřelo po celém povrchu. Přebytná tekutina byla odsáta pipetou a povrch agaru se nechal 15 minut vysušit.
5. Proužek E-testu byl vyjmut pomocí sterilní pinzety a správnou stranou přiložen na povrch agaru a lehkým přitlačením pinzetou uchycen na agar. Umístěný proužek již nemůže být přemístěn.

6. Misky byly inkubovány dnem vzhůru při 37°C, 16 – 20 hodin, poté byly odečítány výsledné MIC podle manuálu bioMérieux přiloženého k testu.

4.2.3 Selekce rezistentních mutant

Bylo prováděno několik druhů selekce rezistentních mutant. Selekce jedнокroková, při níž byl na bakterie vyvíjen selekční tlak po krátkou dobu, a selekce vícekroková, u které byl selekční tlak dlouhodobější. Jedнокroková selekce probíhala buď bez kultivace s antibiotikem (*jednoduchá jedнокroková selekce*), nebo s kultivací s antibiotikem o různých koncentracích (*jedнокroková selekce s vyšším selekčním tlakem*). Vícekroková selekce byla prováděna ve dvou variantách nazvaných „*selekce na základě výběru kolonie s nejvyšší MIC*“ a „*selekce na základě celé populace*“. Těmito metodami byly získávány mutantní kmeny, u kterých byl navozen různý stupeň rezistence. Součástí jedнокrokové i vícekrokové selekce bylo určení profilu populační analýzy (PAP) odhalující i počínající rezistenci.

4.2.3.1 Určení PAP

1. Kmeny byly za sterilních podmínek rozetřeny na miskou s BHI agarem a kultivovány 24 hodin při 37°C. Následně byla jedna kolonie odebrána a rozptýlena ve 3 ml BHI media:
 - a) u *jednoduché jedнокrokové selekce* bez přídavku antibiotika
 - b) u selekce *jedнокrokové s vyšším selekčním tlakem* a obou vícekrokových selekcí bez i s přídavkem antibiotika o různých koncentracích.

Kultivace probíhala 16 - 18 hodin při 37°C a 200 rpm.

2. Suspenze každého kmene byla naředěna 10^0 - 10^{11} krát. Z posledních 7 ředění bylo vynášeno vždy 10 µl na misky s BHI agarem bez přídavku antibiotik a z prvních 7 ředění taktéž 10 µl na misky s BHI agarem a přídavkem vankomycinu o koncentracích: 0,5; 1; 2; 4; 8; 16 µg/ml a teikoplaninu: 0,5; 1; 2; 4; 8; 16; 32 µg/ml . Kultura byla na misky očkovaná multikanálovou pipetou kolmo k misce a daný objem se nechal stéct téměř ke spodnímu okraji misky.
3. Po dvaceti čtyřech hodinách kultivace v termostatu při 37°C byly spočteny jasně rozlišitelné narostlé kolonie na všech miskách a dané číslo vzhledem k ředění bylo přepočteno na CFU/ml. U misek, kde kmen rostl již v souvislém povlaku, a nebylo

možné rozlišit jednotlivé kolonie, byl uveden počet CFU/ml = 0. Tento způsob růstu byl zanedbán, poněvadž nebyla prokázána schopnost jednotlivých populací buněk růst na dané koncentraci antibiotika.

4. Počty CFU/ml byly vyneseny jako dekadické logaritmy oproti koncentraci daného antibiotika do grafu. Křivka znázorňuje profil populační analýzy (PAP) růstu daného kmene.
5. Z misek s nejvyšší koncentrací vankomycinu a teikoplaninu, na kterých byl daný kmen schopen růst, bylo vybráno vždy 5 kolonií buněk. Tyto vybrané kolonie byly rozptýleny v 300 µl BHI média s přidavkem 1% glycinu a uchovány při -80 °C.
6. Posléze byla testována jejich MIC k příslušnému antibiotiku mikrodiluční metodou.

4.2.3.2 Jednokroková selekce

Při *jednoduché jednokrokové selekci* (viz obrázek 11) byla u kmenů provedena populační analýza růstu kmenů na miskách se zvyšujícími se koncentracemi vankomycinu a teikoplaninu, viz 4.2.3.1; 1. a). *Jednokroková selekce s vyšším selekčním tlakem* se lišila jen prvním krokem populační analýzy (1. b), kdy byly kmeny kultivovány v BHI médiu jak bez antibiotika, tak s přidavkem antibiotika o koncentraci 1; 2; 4; 8; 16 µg/ml.

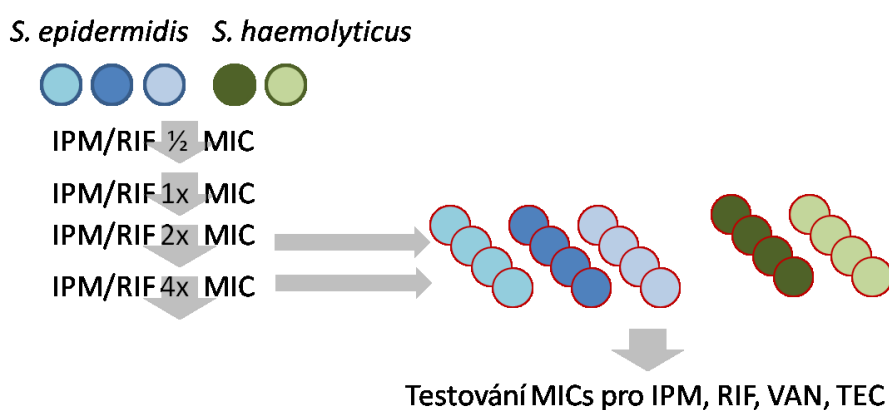


Obr. 11 - Schéma *jednoduché jednokrokové selekce* a *vícekrokové selekce s výběrem kolonie s nejvyšší MIC*

4.2.3.3 Vícekroková selekce

Při *vícekrokové selekci s výběrem kolonie s nejvyšší MIC* (viz obr. 11) byla provedena PAP, kdy v 1. b) byly použity koncentrace VAN: 0,5; 1; 2; 4; 8; 16 µg/ml a TEC: 0,5; 1; 2; 4; 8; 16; 32 µg/ml. Jeden kmen byl tedy kultivován v 7 zkumavkách s BHI médiem a přidavkem různých koncentrací VAN a 8 zkumavkách s různými koncentracemi TEC. Populační analýza byla dále pozměněna tak, že na misky byly vysévány kultury ze všech zkumavek, ve kterých daný kmen rostl. Z misek s nejvyšší koncentrací vankomycinu a teikoplaninu, která ještě nezpůsobila inhibici růstu, bylo vybráno vždy 5 kolonií buněk a jejich MIC k VAN a TEC testována mikrodiluční metodou. Kolonie s nejvyššími MIC byly následně podrobeny dalším kolům selekce, až do úplné inhibice růstu kultury.

Vícekroková selekce na základě celé populace, znázorněná na obrázku 12, je oproti předchozímu způsobu zjednodušená. Tato metoda byla prováděna při selekci zkřížené rezistence imipenemu či rifampicinu a glykopeptidů. Kmen byl v tomto případě kultivován v 5 ml BHI média (podmínky jsou stále stejné) s postupně se zvyšující koncentrací IPM/RIF, počínaje subinhibiční koncentrací, kdy byl vždy po 16 - 18 hodinách kultivace 1 ml kultury přenesen do 4 ml BHI média s dvojnásobně vyšší koncentrací antibiotika. Přenášena byla tedy celá populace buněk. Populační analýza byla prováděna až u kmenů, které rostly v tekutém médiu o koncentraci antibiotik vyšší (2 – 2048 krát), než je jejich MIC. Následně byla testována MIC k VAN, TEC, RIF/IPM kolonií buněk z misek s nejvyšší koncentrací antibiotika.



Obr. 12 – Schéma *vícekrokové selekce na základě celé populace*

4.2.4 Transformace

Pro úspěšnou transformaci, která má za cíl vnesení cizorodé DNA a její začlenění do recipientského organismu, musí být zajištěn kompetentní stav buněk recipienta. Některé buňky dokáží kompetenci navodit přirozeně, ale u většiny ostatních je nutné ji uměle vyvolat určitými modifikacemi buněčné stěny

4.2.4.1 Příprava kompetentních buněk

a) Pro transformaci teplotním šokem (*E. coli* JM 109, IMO8B)

1. Bakteriální kmen byl naočkován na plotny s LB agarem a ponechán kultivovat 16-20 hodin při 37°C.
2. Následně bylo vytvořeno inokulum rozptýlením jedné kolonie do 2 ml LB média a kultivací 16 – 18 hodin, při 37°C za provzdušňování na třepačce při otáčkách 200 rpm.
3. Druhý den bylo připraveno 110 ml obohaceného LB média s přísadkou 10 mM MgSO₄ (1,1 ml 1M MgSO₄) a 0,2% glukózy (1,1 ml 20% glukózy). 10 ml média bylo sterilně přeneseno do zkumavky.
4. Do 100 ml obohaceného LB média o teplotě 37°C byl přenesen 1 ml inokula a kultura se nechala růst za provzdušňování na třepačce (200 rpm) do dosažení OD₆₀₀ = 0,4 – 0,6.
5. Následně byla kultura zchlazena umístěním baňky na led a poté přelita do vychlazených 50 ml centrifugačních zkumavek. Bakteriální buňky byly sedimentovány centrifugací při 1500x g, 11 minut, 4°C.
6. Supernatant byl odsát a pelet za neustálého chlazení opatrně rozptýlen v 1 ml obohaceného LB média pomocí pipetování. Bylo přidáno 5 ml média na uchování buněk a celý obsah byl opatrně promíchán.
7. Kompetentní buňky byly rozděleny po 100 µl do vychlazených mikrozkušavek a uchovávány při - 80°C.

b) Pro transformaci elektroporací (NE823, RN4220)

1. Bakteriální kmen byl naočkován na plotnu s BHI agarem (v případě kmene NE823 obohacenou o ERY s výslednou koncentrací 5 µg/ml) a kultivován 16 – 20 hodin při 37°C.
2. Následně bylo vytvořeno inokulum rozptýlením jedné kolonie do 5 ml BHI média (v případě NE823 s přísadkou erytromycinu) a kultivací 16 – 18 hodin, při 37°C za provzdušňování na třepačce při otáčkách 200 rpm.

3. Byl odebrán 1 ml inokula a přenesen do 50 ml BHI média (v případě NE823 s přidavkem erytromycinu) o teplotě 37°C. Kultura byla kultivována při 37°C, 200 rpm až do dosažení $OD_{600} = 0,5 - 0,8$.
4. Buněčná kultura byla přelita do 50 ml centrifugačních zkumavek a centrifugována při 8000x g, 10 minut a teplotě 20°C.
5. Supernatant byl odlit a pelet promyt v 50 ml deionizované vody a centrifugován při 8000x g, 15 minut a teplotě 20°C.
6. Po vylití supernatantu byly buňky rozptýleny ve 20 ml 10% glycerolu a 15 minut inkubovány. Následně byly centrifugovány při 8000x g, 15 minut a teplotě 20°C.
7. Buňky byly naposledy rozptýleny v 5 ml 10% glycerolu a centrifugovány při 8000x g, 10 minut a teplotě 20°C.
8. Pelet byl nakonec rozptýlen v 800 µl média na uchování buněk, suspenze kompetentních buněk byla rozdělena do mikrozkušavek po 80 µl a uchována při - 80°C.

4.2.4.2 Transformace

a) Transformace kompetentních buněk *E. coli* (JM109, IMO8B) teplotním šokem

1. Ke 100 µl kompetentních buněk byl přidán 1 µg plazmidové DNA. Poklepáním na dno mikrozkušavky byla směs promíchána a inkubována 30 min na ledu, v průběhu inkubace byla směs stejným způsobem několikrát promíchána.
2. Buňky byly vystaveny teplotnímu šoku vložením mikrozkušavek do termo bloku o teplotě 42°C na 45 – 60 sekund. Po uplynutí této doby byly ihned zchlazeny na ledu po dobu 1 – 2 minut.
3. Poté byl přidán 1 ml LB média a buněčná suspenze byla kultivována při 37°C, 200 rpm po dobu 1 hodiny.
4. Buňky byly krátce sedimentovány centrifugací (1500x g, 2 min), LB médiu bylo odstraněno tak, aby zůstalo cca 100 µl. Buněčný pelet byl v tomto objemu rozptýlen a vyset na LB agar s přidavkem příslušného selekčního antibiotika.
5. Transformované buňky byly kultivované při 37°C, 200 rpm, 20 - 24 hodin.

b) Transformace kompetentních buněk *S. aureus* (NE823, RN4220) elektroporací

1. K 80 µl kompetentních buněk byl přidán 1 µg plazmidové DNA, vše bylo promícháno poklepáním na dno mikrozkušavky a inkubace probíhala 30 min při pokojové teplotě.

2. Buňky byly přeneseny do vychlazených elektroporačních kyvet a vystaveny na 1 s elektrickému pulzu (300 V, 32 μ F).
3. Následně byl ihned přidán 1 ml B2 média a směs byla promíchána opatrně pipetou. Bakteriální suspenze byla z kyvet přenesena do mikrozkušavky a kultivována 1 hodinu za stálého provzdušňování na třepačce (200 rpm).
4. Kultura transformovaných buněk byla krátce stočena na centrifuze (1500x g, 2 min), supernatant odstraněn tak, aby zbylo cca 100 μ l, které byly následně vysety na misky s příslušným selekčním antibiotikem.
5. Buňky byly kultivovány 24 hodin při teplotě 37°C.

4.2.5 Izolace DNA

4.2.5.1 Izolace plazmidové DNA

Izolace plazmidové DNA probíhala za využití komerčně dostupné soupravy Wizard®Plus Midipreps DNA Purification Systém (Promega), podle návodu uvedeného výrobcem.

4.2.5.2 Izolace genomické DNA *S. epidermidis* a *S. haemolyticus*

1. Do 5 ml BHI média s přidavkem 1% glycinu byla přenesena 1 kolonie kmene a nechala se kultivovat 16 - 18 hodin při teplotě 37°C a provzdušňování na třepačce (200 rpm).
2. Druhý den byla bakteriální kultura centrifugována 10 minut při 2000x g a supernatant byl odstraněn.
3. Sediment byl rozptýlen v 250 μ l TES pufru, k němuž bylo přidáno 25 μ l lysozymu (20mg/ml) a 25 μ l lysostafinu (1 mg/ml). Směs se protřepala a inkubovala při teplotě 37°C, 1 hodinu.
4. Buňky byly centrifugované při 6500x g, 5 minut a supernatant byl odsát.
5. Sediment byl rozptýlený v 1 ml Cell Lysis Müller pufru a k suspenzi bylo přidáno 70 μ l 10% SDS, 20 μ l proteinázy K (20 mg/ml) a 20 μ l ribonukleázy A (20mg/ml). Směs byla inkubována při teplotě 55°C po dobu 1 hodiny, kdy došlo k lyzi buněk a pročištění suspenze.
6. Po inkubaci byla směs zchlazená na laboratorní teplotu a bylo přidáno 333 μ l nasyceného roztoku NaCl. Celý objem byl promíchán vortexem za vysrážení proteinů (mléčný zákal).

7. Opět byla směs centrifugována 30 min při 6500 xg a supernatant byl přemístěn do sterilní mikroskopické kumavky.
8. K 1 ml supernatantu bylo přidáno 0,6 ml izopropanolu, následně byla směs promíchána vortexem, kdy došlo k precipitaci DNA. Následná centrifugace probíhala 15 minut při 6500x g a poté byl odstraněn izopropanol.
9. Pelet byl promyt 500 μ l 70% etanolu a směs poté centrifugována 5 minut při 6500x g za odstranění soli.
10. Etanol byl odstraněn a vzorek se nechal důkladně vysušit.
11. Izolovaná genomická DNA byla rozptýlena ve 100 μ l TE⁻¹ pufru (v případě vzorků, které nebyly určeny k sekvenci byl pufr obohacen 5 μ l ribonukleázy A) a nechala se rozpouštět při 55°C 1 hodinu, nebo alternativně při 4°C přes noc.
12. Koncentrace DNA (A_{260}) a míra znečištění (poměr $A_{260/280}$ a $A_{260/230}$) byla zjišťována spektrofotometricky pomocí přístroje NanoDrop a posléze byla čistota ověřena pomocí DNA agarózové elektroforézy.
13. V případě znečištěného vzorku bylo zopakováno několik kroků izolace: nejprve byly přidány 2 μ l ribonukleázy A a směs se nechala inkubovat 1 hodinu při 37°C, následně bylo přidáno 33 μ l nasyceného roztoku NaCl, vše bylo vortexováno a byly znovu provedeny kroky 8. – 12. tohoto protokolu.

4.2.6 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Tato metoda má za cíl zmnožit konkrétní úsek DNA, využívá k tomu aktivity termostabilní DNA polymerázy. Amplifikace DNA probíhá opakovaně v teplotních cyklech: denaturace DNA, připojení primerů, syntéza DNA. Při koloniové PCR slouží jako templát genetický materiál přímo z jedné, do reakce vložené, bakteriální kolonie daného kmene. Reakce probíhaly v PCR cycleru (My Cycler Bio-Rad).

Složení PCR reakce	Objem
10x Taq reakční pufr	2 μ l
Taq DNA polymeráza	0,2 μ l
dNTPs mix	2 μ l
Primer F	0,5 μ l
Primer R	0,5 μ l
Templátová DNA	1 μ l
Destilovaná voda	13,8 μ l
Celkový objem	20 μ l

Cyklus	Teplota	Čas	Opakování
denaturace DNA	95 °C	4 min	1x
amplifikace DNA	95 °C	15 s	35x
	50 °C	30 s	
	72 °C	1 min	
uchování DNA	15 °C	1 hod	1x

Jak koloniová, tak klasická PCR byla využívána pro ověření správnosti transformace mutované a nemutované varianty *vraS*, nesené na plazmidu pRMC2, do kmene NE823 a také pro ověření přítomnosti inzertovaného transpozonu ve *vraS* v genomu kmene NE823. Primery používané při PCR reakcích jsou uvedeny v tabulce č. 3 kapitoly 4.1.5.

4.2.7 Elektroforetická separace molekul

Pro separaci a vizualizaci molekul DNA, popřípadě kontrolu jejich čistoty, byla využita elektroforetická separace nukleových kyselin v agarózovém gelu.

1. Byl připraven 1% agarózový gel rozpuštěním 1g agarózy ve 100 ml 1x TAE pufru. Do tekutého, ale lehce zchlazeného gelu bylo přidáno 5 μ l ethidium bromidu za účelem vizualizace DNA pod UV světlem. Gel byl ponechán v aparatuře ztuhnout cca 20 min.
2. Ke vzorkům byla přidána 1/10 objemu 10x koncentrovaného vzorkového pufru a do jamek bylo nanášeno 5 μ l směsi. Jako standard velikosti byl použit 1 kb Plus DNA Ladder.
3. Elektroforetická reakce byla prováděna za laboratorní teploty, při napětí 80 V po dobu 1 hodiny.

4.2.8 Fenotypová analýza

Analýza fenotypu byla prováděna u selektovaných mutantních kmenů *S. haemolyticus* a *S. epidermidis* (*S. pasteurii*) v porovnání s rodičovskými kmeny s cílem identifikovat změny způsobené mutacemi. V experimentální části byly prováděny dvě metody fenotypické analýzy: testování produkce biofilmu a testování autolýzy vyvolané Tritonem X-100.

4.2.8.1 Testování produkce biofilmu

Produkce biofilmu byla testována v mikrotitračních 96 jamkových destičkách v přítomnosti 1% glukózy a bez nebo s přidavkem subinhibiční koncentrace antibiotik: vankomycinu a teikoplaninu, podle protokolu z článku Mgr. Vladimíra Vimberga, PhD. (Vimberg et al. 2015). Produkce biofilmu u konkrétního kmene byla tedy vždy testována ve třech variantách. Vytvořený biofilm byl barven krystalovou violetí.

1. Ve variantě bez antibiotik bylo do každé jamky mikrotitrační destičky napipetováno 100 μ l TSB média obohaceného o 1% glukózu. U varianty s antibiotikem (VAN nebo TEC) bylo nejprve rozvrženo pořadí pipetování testovaných kmenů tak, že byla určena subinhibiční koncentrace k danému ATB u všech kmenů (podle subinhibiční koncentrace rodičovských

kmenů) a následně bylo do každé jamky naneseo 100 μ l TSB média obohaceného o 1% glukózu a danou subinhibiční koncentraci VAN/TEC.

2. Do jamky bylo přidáno vždy 5 μ l inokula o zákalu 0,5 McFarlanda vytvořeného z testovaného kmene. Inkubace v igelitu zabalené uzavřené destičky následně probíhala při 37°C, 24 hod. Pro kontrolu vždy alespoň do 2 jamek nebyla přidána buněčná suspenze.
3. Po uplynutí inkubační doby byla vylita buněčná suspenze z jamek. Do nesterilní kádě s vodou byla namočená destička a voda opět vylita, toto bylo opakováno 3x.
4. Následně byla odsáta voda z jamek mikrotitrační destičky na buničité vatě.
5. Vytvořený biofilm byl barven 50 μ l 1% krystalové violeti. Inkubace probíhala 15 minut při laboratorní teplotě a následně byla barva odstranění promytím 5x v nesterilní vodě.
6. Destička byla důkladně osušena v laminárním boxu (do úplného odstranění kapek vody)
7. Bylo přidáno 100 μ l 96% etanol, který uvolnil krystalovou violeť navázanou na biofilm.
8. Bylo změřeno OD₆₃₀ a odečtena kontrola od ostatních vzorků.

Testování produkce biofilmu bylo provedeno u všech kmenů ve třech opakováních. Za producenta silného biofilmu byl považován kmen, u něhož byl průměr třech měření OD₆₃₀ vyšší než 0,240. Producent středně silného biofilmu vykazoval průměrné hodnoty OD₆₃₀ v rozmezí 0,120 – 0,240. Kmeny, u nichž byl průměr v rozmezí 0,100 – 0,119 byly považovány za producenty slabého biofilmu.

4.2.8.2 Testování autolýzy

Autolýza byla nejprve testována jedním protokolem, u něž nebyly sledovány hodnoty optické denzity kultury, což je u autolýzy klíčový parametr. Následně byl testován protokol z článku „Autolytic activity and molecular characteristics of *Staphylococcus haemolyticus* strains with induced vancomycin resistance“ (Kim et al. 2012), jehož postup zde uvádím. Bohužel autolýza kontrolního kmene nedosahovala patřičných hodnot a z časových důvodů se nepodařilo tento experiment optimalizovat.

1. 1 kolonie testovaného kmene byla přenesena do 5 ml BHI média a kultivována při 37°C, 200 rpm exponenciálně do OD₆₀₀ = 0,3 – 0,5. Jako kontrolní kmen sloužil *S. aureus* RN4220.
2. Kultura byla rychle zchlazena a centrifugována při 2000x g, 3 minuty.

3. Pelet byl promyt ledově vychlazenou destilovanou vodou, stočen (2000x g, 3 minuty) a následně rozptýlen v 50 mM Tris/HCl (pH = 7,5) a 0,1% Tritonu X-100 tak, aby byla získána kultura o $OD_{600} = 1$.
4. Z buněčné suspenze bylo 100 μ l přeneseno do mikrotitrační destičky. Kultivace bakterií probíhala v destičce, při 37°C a za stálého třepání. Byly měřeny změny v OD_{600} po dobu 2 hodin.
5. Výsledky byly normalizovány na OD_{600} v čase 0 (OD_0) bylo vypočteno procento lyze v čase podle vzorce $t = [OD_0 - OD_t] / OD_0 \times 100$.

5 Výsledky

Má diplomová práce se zabývá studiem vzniku rezistence ke glykopeptidovým antibiotikům u koaguláza-negativních stafylokoků. Ačkoli jsou významnými nozokomiálními patogeny, genetická podstata vzniku rezistence ke glykopeptidům u nich nebyla doposud objasněna. Na základě předchozích výsledků publikovaných mými kolegy můžeme usuzovat, že mechanismus vzniku rezistence je podobný jako u *S. aureus*. Fenotypové projevy glykopeptid-rezistentních buněk *S. aureus* a buněk koaguláza-negativních stafylokoků jsou analogické: ztlustění buněčné stěny, snížená citlivost k lyzostafinu a redukce autolýzy (Vimberg et al. 2018a). Je tedy pravděpodobné, že i genetický princip rezistence bude podobný, s odchylkami charakteristickými pro daný stafylokokový druh.

Genetickou podstatu rezistence jsme se rozhodli zkoumat na izogenních párech 2 klinických izolátů stejného kmene, z nichž jeden je citlivý a druhý (izolovaný po delším čase podávání antibiotika) již rezistentní. Vzhledem k tomu, že jsme neměli k dispozici tyto izogenní páry ve sbírce klinických izolátů, získávali jsme je selekcí rezistence *in vitro*, tedy v laboratorních podmínkách. U vybraných klinických kmenů byl navozen vznik rezistence působením selekčního tlaku v přítomnosti glykopeptidového či neglykopeptidového antibiotika. Následně byly genomy rezistentních mutant podrobeny sekvenaci a analýzou jedno nukleotidových polymorfismů (SNP) byly identifikovány mutace, které odlišují rezistentní od citlivých kmenů.

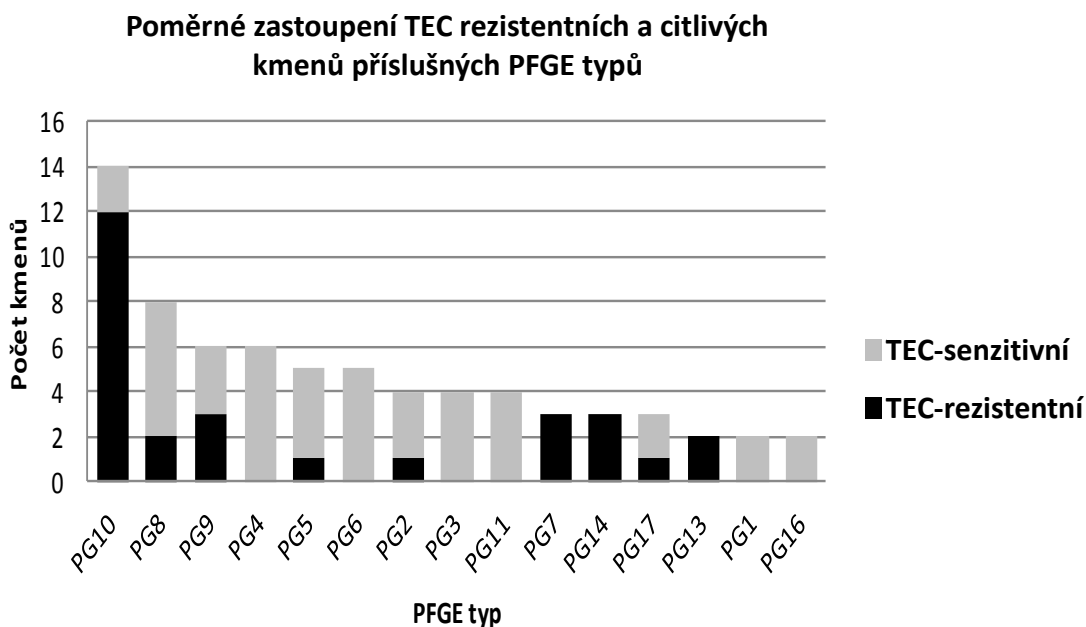
Testovali jsme několik postupů selekce rezistentních mutant. Selekcí jedнокrokovou, a vícečrokovou, s různými modifikacemi (viz kapitola 4.2.3). Cílem experimentů bylo vyselektovat jak teikoplanin, tak vankomycin rezistentní mutanty. Poněvadž ve sbírce klinických izolátů nebyl nalezen žádný vankomycin rezistentní kmen, jsou následující studie zaměřeny převážně na *in vitro* selekcí rezistence k vankomycinu.

5.1 *In vitro* selekce mutant *Staphylococcus epidermidis* rezistentních ke glykopeptidovým antibiotikům

Pro selekcí rezistentních mutant jsme využívali jak metodu *jednoduché jedнокrokové selekce*, tak i *vícečrokovou selekcí s výběrem kolonie s nejvyšší MIC*. Já jsem prováděla jedнокrokovou selekcí, proto se budu věnovat především jejím výsledkům a následně pouze porovnávat účinnost jedнокrokové a vícečrokové selekce.

5.1.1 Charakterizace sbírky *S. epidermidis* a výběr kmenů vhodných pro selekci rezistentních mutant

Kmeny pochází ze sbírky 100 izolátů klinických vzorků pacientů z Ústavu hematologie a krevní transfúze a Všeobecné fakultní nemocnice. Sbíрка byla vytvořena v krátkém časovém úseku (cca 3 měsíců) v roce 2015 a byly do ní zahrnuty všechny klinicky relevantní izoláty nezávisle na rezistenci. Následně byla charakterizována v naší laboratoři, kdy u všech vzorků byla stanovena citlivost k vankomycinu a teikoplaninu pomocí mikrodiluční metody a E-testem. Z důvodu nekonzistentních výsledků byly vzorky testovány navíc agarovou diluční metodou, která je považována za „zlatý standard“. **Podle komise EUCAST se za citlivý považuje kmen CoNS s minimální inhibiční koncentrací ke glykopeptidům nižší nebo rovnou 4 mg/l a rezistentní s MIC vyšší než 4 mg/l.** Žádný z izolátů nebyl rezistentní k vankomycinu a rezistence k teikoplaninu byla detekována u 25 izolátů. Pro další analýzu bylo ke sbírce přidáno dalších 21 kmenů rezistentních k teikoplaninu (16 kmenů nazvaných GPR s MIC v rozmezí 8 – 16 mg/l a 5 kmenů s MIC v rozmezí 16 – 32 mg/l). U těchto 121 izolátů byla Mgr. Leonou Zieglerovou stanovena klonální příbuznost porovnáním *SmaI* restričních profilů na PFGE. 72 kmenů bylo rozděleno do 15 skupin s klonální příbuzností, ostatní nevykazovaly vzájemnou podobnost.



Obr. 13 - Poměrné zastoupení TEC rezistentních a citlivých kmenů příslušných klonálních typů. Upraveno podle: Novotná, AZV 15-28807A Dílčí zpráva (2016)

Z celkového počtu 44 teikoplanin rezistentních izolátů bylo 29 rozřazeno do klonálních skupin. V jednotlivých skupinách je různé zastoupení TEC rezistentních kmenů, nejvyšší pak ve skupině PG10 (viz obr. 13).

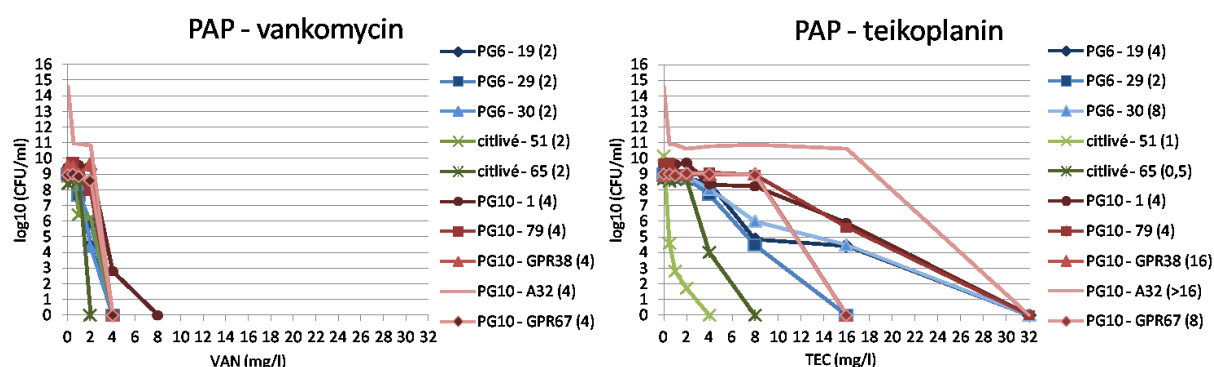
Pro selekci rezistence bylo vybráno 11 kmenů *S. epidermidis* ze tří klonálních skupin (PG4, PG6, PG10) a dva nepříbuzné kmeny plně citlivé na VAN a TEC (viz tabulka č. 6). Tři kmeny vždy ze stejné klonální skupiny byly zvoleny kvůli testování, zda dojde u geneticky příbuzných izolátů k selekci rezistence podobným mechanismem, tedy zda budou identifikovány mutace ve stejných genech. To by naznačovalo, že schopnost vyvíjet rezistenci je geneticky podmíněná. Při výběru konkrétních izolátů rozhodovala jak citlivost k VAN a TEC, tak vzájemná podobnost. Byly vytipovány 2 dvojice izolátů s identickými PFGE profily, lišící se citlivostí k VAN a TEC. Izoláty 43 a 97 z klonální skupiny PG4 a izoláty 29 a 30 náležící do skupiny PG6, z každé skupiny byl vybrán ještě jeden izolát plně citlivý k TEC. Větší počet izolátů ze skupiny PG10 byl zvolen z toho důvodu, že u těchto je zvýšený výskyt rezistence k TEC, a tudíž u nich předpokládáme predispozici k selekci glykopeptidové rezistence. Navíc byla skupina PG10 v klinické sbírce *S. epidermidis* nejpočetnější, tím pádem mechanismus selekce rezistence u této klonální skupiny pravděpodobně nejvíce odpovídá reálné selekci rezistence v nemocničním prostředí. Z této skupiny byly vybrány jediné dva izoláty citlivé na vankomycin a teikoplanin a následně byly doplněny dalšími třemi kmeny s hraniční citlivostí k vankomycinu a již vyvinutou rezistencí k teikoplaninu. Rezistentní kmeny byly zahrnuty za účelem ověřit hypotézu, zda existuje zvýšené riziko vzniku VAN rezistentních mutantů u geneticky příbuzných TEC rezistentních izolátů. Původní hodnota citlivosti k VAN se u všech kmenů pohybovala v rozmezí 2 – 4 mg/l.

		MIC (mg/l)	
skupina	kmen	VAN	TEC
PG4	43	4	1
	46	2	2
	97	2	8
PG6	19	2	4
	29	2	2
	30	2	8
PG10	1	4	4
	79	4	4
	GPR38	4	>16
	GPR67	4	8
	A32	4	>16
citlivé	51	2	1
	61	2	0,5

Tab . 6 - Vybrané kmeny *S. epidermidis* pro selekci rezistentních mutantů

5.1.2 Frekvence vzniku rezistentních mutant *S. epidermidis* po jedнокrokové selekci na VAN a TEC

Jednoduchá jedнокroková selekce byla provedena tak, jak je popsáno v kapitole 4.2.3.2. Z křivek PAP grafu 14B je patrné, že klinické kmeny *S. epidermidis* jsou schopny růst v širokém rozmezí koncentrací teikoplaninu od 0,5 do 32 mg/l. I citlivé kmeny, jejichž původní minimální inhibiční koncentrace k teikoplaninu nedosahovala rezistenční hladiny, jsou po jedнокrokové selekci schopny růst v koncentracích vyšších než 4 mg/l a jejich citlivost k teikoplaninu se pravděpodobně snižuje. Oproti teikoplaninu, je škála koncentrací vankomycinu, na kterých jsou schopny tytéž kmeny růst, poměrně užší a pohybuje se v rozmezí od 0,5 do 8 mg/l (viz graf 14A). Zdá se tedy, že citlivost k vankomycinu se po jedнокrokové selekci výrazně nesnižuje. Tyto předpoklady budou dále ověřovány testováním MIC izolovaných kolonií.



Obr. 14A, B – Populační analýza růstu kmenů klonálních skupin: PG6 (odstíny modré), PG10 (odstíny červené) a nepříbuzných citlivých izolátů (odstíny zelené) na vankomycinu (14A) a teikoplaninu (14B). V závorkách za čísla kmenů jsou uvedeny původní MIC v mg/l. Na ose y jsou uvedeny počty CFU/ml (log₁₀) a na ose x koncentrace vankomycinu či teikoplaninu.

Křivky získané PAP metodou (viz grafy 14A, 14B.) mají pro jednotlivé klonální skupiny podobný tvar, i přesto, že měly kmeny dané skupiny rozdílnou citlivost k danému antibiotiku (u teikoplaninu). To nepřímo potvrzuje naši hypotézu, že geneticky příbuzné kmeny vykazují podobnou frekvenci vzniku rezistence a k rezistenci dochází podobnými mechanismy. Přímou může být hypotéza ověřena až analýzou genomů rezistentních mutant odvozených z kmenů stejných PFGE typů.

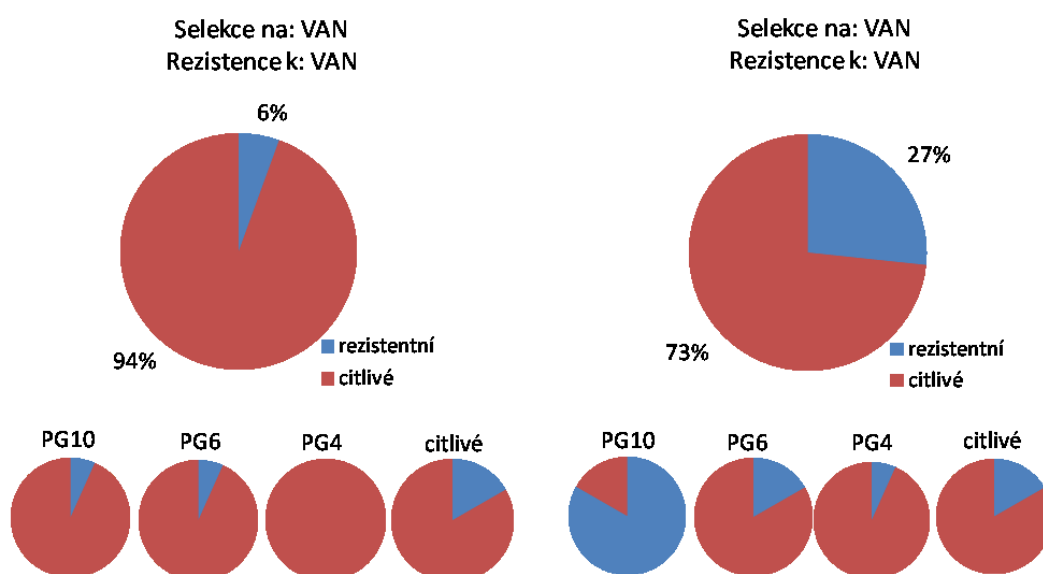
Testováním MIC vybraných kolonií z misek o nejvyšší koncentraci antibiotik jsem ověřila citlivost daných kolonií k VAN/TEC a získala tak frekvenci vzniku mutant po jedнокrokové selekci na vankomycinu a teikoplaninu (viz Tab. 7). I přesto, že rostly kolonie na miskách s vyšší koncentrací glykopeptidů, než byla původní MIC, tak u velké části testovaných kolonií nebylo zvýšení MIC potvrzeno.

Mutanty rezistentní k vankomycinu byly izolovány s nižší frekvencí, než mutanty rezistentní k teikoplaninu. Při selekci vankomycinové rezistence na miskách s vankomycinem byly získány pouze 3 rezistentní mutanty, což odpovídá 6 % z celkového počtu selektovaných mutant. Při selekci vankomycinové rezistence na miskách s teikoplaninem vznikla dokonce jen jedna rezistentní mutanta (2 % z celkového množství vybraných mutant). Selektace rezistence k teikoplaninu byla úspěšnější, kdy při selekci na vankomycinu frekvence vzniku TEC rezistentních mutant dosahovala 27 % (8 rezistentních mutant) a při selekci na teikoplaninu dokonce 38 % (9 rezistentních mutant). Do výsledné tabulky nebyl zahrnut výsledek selekce teikoplanin rezistentních mutant z kmenů, které byly již původně rezistentní k teikoplaninu, i když se jejich MIC k teikoplaninu zvýšila. Z těchto původních teikoplanin rezistentních kmenů skupiny PG10 (GPR67, GPR38, A32) se neselektovala žádná mutanta rezistentní k vankomycinu, tudíž můžeme říci, že za daných podmínek selekce rezistence nebylo prokázáno zvýšené riziko vzniku VAN rezistence u geneticky příbuzných TEC rezistentních izolátů.

		počet rezistentních klonů v %			
selekce na:	rezistence k:	PG10	PG6	PG4	citlivé
VAN	VAN	6,7 % (1/15)	6,7 % (1/15)	0 (18)	16,7 % (1/6)
VAN	TEC	83,3 % (5/6)	16,7 % (1/6)	6,7 % (1/12)	16,7 % (1/6)
TEC	VAN	6,7 % (1/15)	0 (15)	0 (18)	0 (6)
TEC	TEC	100 % (6/6)	33,3 % (2/6)	0 (6)	16,7 % (1/6)

Tab. 7 - Frekvence vzniku rezistentních mutant *S. epidermidis* po jedнокrokové selekci na vankomycinu a teikoplaninu.

Na výšečových grafech obrázku 15 je graficky znázorněna frekvence vzniku rezistentních mutant u všech skupin *S. epidermidis* po jednokrokové selekci na vankomycinu. Rezistence k teikoplaninu (pravý graf obrázku 15) je selektována s výrazně vyšší četností, než rezistence k vankomycinu (levý graf obrázku 15). Na menších výšečových grafech jsou zobrazeny výsledky selekce pro jednotlivé klonální skupiny. Zdá se, že vzniklá rezistence ke glykopeptidovým antibiotikům je geneticky podmíněná, poněvadž frekvence selekce rezistentních mutant se u jednotlivých klonálních skupin liší. U jednokrokové selekce VAN a TEC rezistentních mutant na miskách s teikoplaninem vycházely podobné hodnoty frekvence vzniku rezistentních mutant, proto již výšečové grafy do výsledků nezahrnují.



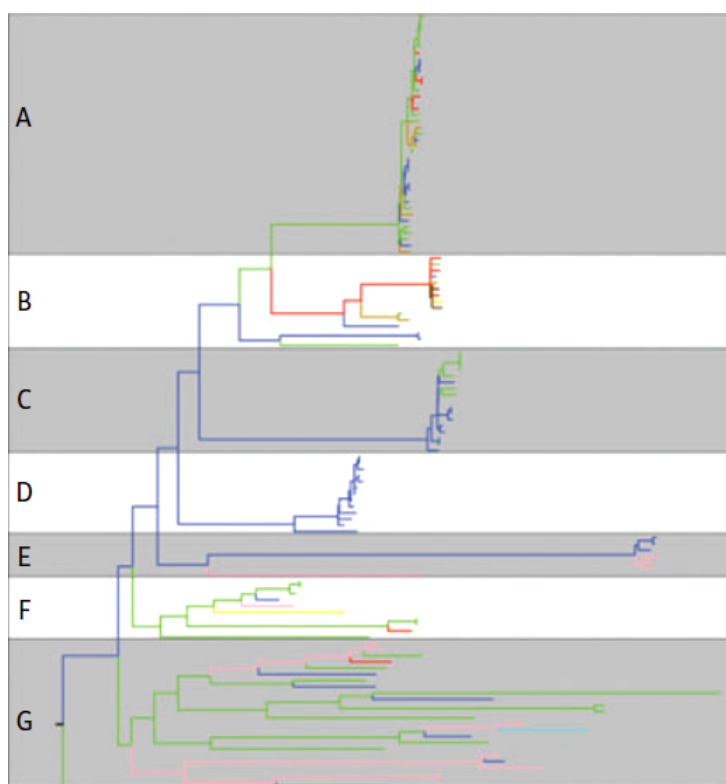
Obr. 15 - Frekvence vzniku mutant rezistentních k VAN/TEC po jednokrokové selekci na vankomycinu. Výšečové grafy v rámečku zobrazují frekvenci vzniku rezistence u všech skupin *S. epidermidis*, kdy rezistentní mutanty jsou znázorněny modrou a citlivé izoláty červenou barvou. Malé výšečové grafy ukazují četnost rezistence u jednotlivých skupin *S. epidermidis*.

5.2 *In vitro* selekce mutant *Staphylococcus haemolyticus* rezistentních ke glykopeptidovým antibiotikům

Jednoduchá jednokroková selekce u S. epidermidis vedla ke vzniku pouze malého množství vankomycin rezistentních mutant, proto byla pro získání mutant *S. haemolyticus* použita ještě navíc *jednokroková selekce s vyšším selekčním tlakem*. Při této metodě byly různé koncentrace vankomycinu přidávány do tekutého média ve fázi primární 24 hodinové inkubace. Tím byl zvýšen selekční tlak a získáno více rezistentních mutant.

5.2.1 Charakterizace sbírky *S. haemolyticus* a výběr kmenů pro selekci rezistentních mutant

K dispozici jsme měli sbírku izolátů Dr. Cavanagh ze spolupracujícího pracoviště Oddělení klinické medicíny Univerzity Tromsø v Norsku. Sbíрка čítala 135 izolátů *S. haemolyticus*. Kmeny pocházely jak z klinického prostředí, tak od zdravých jedinců, dělíme je tedy na klinické a komunitní. Součástí sbírky jsou kmeny původem z různých zemí, jejichž přesný výčet vidíme v tabulce. Genom těchto izolátů byl sekvenován a kmeny byly na základě sekvenční podobnosti rozděleny do 7 kladů (A – G), viz obr. 16 (Cavanagh et al. 2014). V naší laboratoři byla, ve spolupráci s Dr. Pauline Cavanagh, testována citlivost ke glykopeptidům u všech izolátů pomocí E-testu. Všechny testované kmeny byly citlivé k vankomycinu a 22 kmenů vykazovalo rezistenci k teikoplaninu.



Norsko	54
Švýcarsko	43
Japonsko	14
Německo	10
UK	9
Belgie	2
Španělsko	2
USA	1

Obr. 16 - Kladogram kmenů z norské sbírky, definující klady označené A – G. V tabulce jsou uvedeny počty izolátů z konkrétních zemí. Jednotlivé země jsou znázorněny barevně a stejnou barvou jsou vykresleny větve kladogramu příslušící kmenům z dané země. Upraveno podle Cavanagh, 2014.

Při výběru izolátů pro selekci rezistence bylo postupováno podobně jako v případě *S. epidermidis*. Bylo vybráno 16 kmenů řadících se do 3 kladů (A, B, E) geneticky příbuzných klinických izolátů a 1 skupiny nepříbuzných komunitních izolátů (viz Tab. 8).

Kvůli testování hypotézy, zda existuje geneticky podmíněná predispozice ke vzniku rezistence, byly vybrány kmeny příbuzných klinických izolátů se stejným klonálním typem, ale

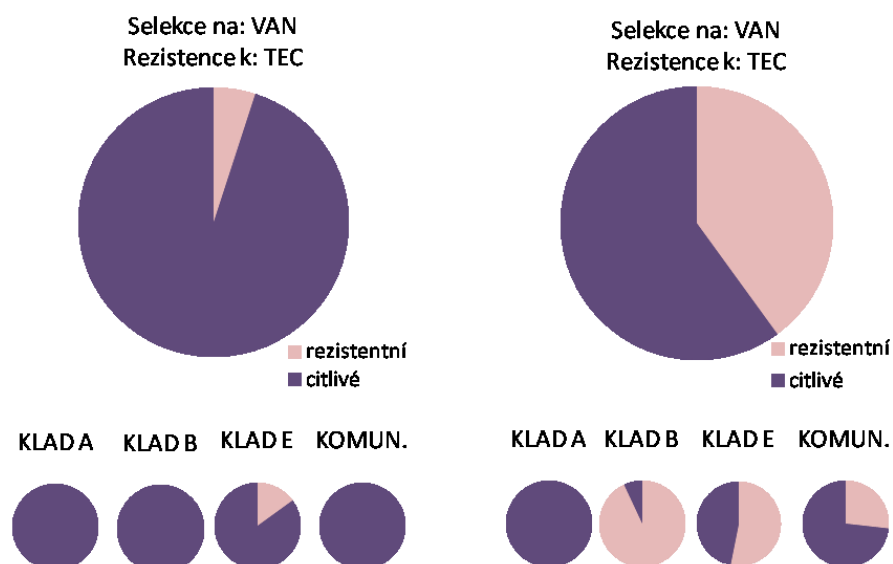
zařazené do různých větví kladogramu (viz Obr. 16). Kmeny jednotlivých větví se liší mírou citlivosti k teikoplaninu. Tři komunitní izoláty pochází z různých klonálních skupin.

původ	skupina	kmen	původní MIC (mg/l)		
			VAN	TEC	
KLINICKÉ	KLAD A	53-24	1	8	
		51-33	0,5	2	
		51-13	0,5	1 (2)	
		53-67	0,25	1	
	KLAD B	53-60	0,5	2	
		54-32	0,5	2	
		53-74	0,5	4	
		51-09	0,5	8 (16)	
	KLAD E	51-41	1	4	
		54-45	0,25	1 (2)	
		54-52	0,5	1 (2)	
		51-43	1	8	
		51-58	2	8	
	KOMUNITNÍ		57-61	0,25	4
			58-04	0,25	2
		57-15	0,25	1	

Tab. 8 - Vybrané kmeny *S. haemolyticus* pro jedнокrokovou selekci VAN/TEC rezistentních mutantů vankomycinem. Tři skupiny klinických izolátů zařazených do kladů (A, B, E) a skupina komunitních izolátů. Pro jednotlivé kmeny jsou uvedeny MIC (mg/l) k vankomycinu (VAN) a teikoplaninu (TEC).

5.2.2 Frekvence rezistentních mutantů *S. haemolyticus* po jednoduché jedнокrokové selekci na vankomycinu

U jednoduché jedнокrokové selekce mutantů rezistentních k vankomycinu a teikoplaninu jsem postupovala stejným způsobem, jako při selekci mutantů *S. epidermidis*. Vankomycin rezistentní mutanty byly získány opět s nižší frekvencí (5 %), viz obr. 17, a to pouze ve skupině kmenů patřících do kladu E, což je zřejmě známkou genetické podmíněnosti vzniku rezistence. Rezistence k teikoplaninu byla selektována s vyšší frekvencí (40 %), viz obr. 17, a k jejímu vzniku nedocházelo pouze u kmenů kladu A. U ostatních skupin k selekci teikoplanin rezistentních mutantů došlo s četností 23 – 97 %.



Obr. 17 - Frekvence vzniku mutant rezistentních k VAN/TEC po jednoduché jedнокrokové selekci na vankomycinu. Výšečové grafy v rámečku zobrazují frekvenci vzniku rezistence u všech skupin *S. haemolyticus*, malé výšečové grafy u jednotlivých skupin.

Protože jedнокroková selekce, prováděná předchozím způsobem vedla, stejně jako u *S. epidermidis* k získu pouze malého množství vankomycin rezistentních mutant, bylo nutné pozměnit experiment a zvýšit selekční tlak na testované kmeny. U zmiňovaných 16 kmenů *S. haemolyticus* jsem tedy použila *jedнокrokovou selekci s vyšším selekčním tlakem*, zajištěným inkubací kultury s antibiotikem, konkrétně vankomycinem (viz. 4.2.3.2.). Mikrodiluční metodou jsem přetestovala MIC k VAN a TEC u 5 kolonií a z výsledných čísel jsem získala frekvenci vzniku rezistentních mutant k VAN a TEC (viz tabulka č. 9).

		počet rezistentních mutant v %			
selekce na:	rezistence k:	KLAD A	KLAD B	KLAD E	KOMUNITNÍ
VAN	VAN	3,2 % (3/94)	13,7 % (13/95)	13,6 % (15/110)	8,3 % (5/60)
VAN	TEC	43,5 % (30/69)	93,3 % (70/75)	70,8 % (46/65)	43,3 % (26/60)

Tab. 9 – Frekvence vzniku rezistentních mutant k VAN a TEC *po jedнокrokové selekci s vyšším selekčním tlakem*. V závorce je uveden počet rezistentních izolátů vzhledem k celkovému počtu testovaných kmenů.

Vankomycin rezistentní mutanty selektované *jedнокrokovou selekci s vyšším selekčním tlakem* vznikají s nižší frekvencí, než teikoplanin rezistentní, stejně jako u *jednoduché jedнокrokové selekce*. S tím rozdílem, že k jejich selekci dochází u všech testovaných skupin *S. haemolyticus*. Nejvíce vankomycin rezistentních mutant pozorujeme u kladů B a E, u nichž je frekvence vzniku rezistence k vankomycinu téměř stejná (14 %).

Teikoplanin rezistentní mutanty detekujeme s nejvyšší frekvencí u kmenů kladu B a poté u kmenů kladu E. Klad A a komunitní izoláty vykazují téměř identickou frekvenci vzniku teikoplaninové rezistence.

Z 5 hodnot MIC, naměřených u 5 kolonií selektovaných z misky s nejvyšší koncentrací VAN, na které byl daný kmen schopen růst, jsem vypočetla medián. Výsledné hodnoty jsou uvedeny v tabulce č. 10. U většiny kmenů pozorujeme rozdílnou MIC původní a po inkubaci v médiu bez přídavku antibiotika (která je u těchto kmenů vyšší), což může být dáno nekonzistentností výsledků při testování citlivosti různými metodami, nebo výskytem heterotezistentních subpopulací. Selekční tlak vankomycinu celkem spolehlivě snižoval citlivost k teikoplaninu (u 14 ze 16 kmenů) a přispíval ke vzniku teikoplanin rezistentních mutant (u 11 ze 16 kmenů), kdy nezahrnuji původně TEC rezistentní izoláty, viz tabulka

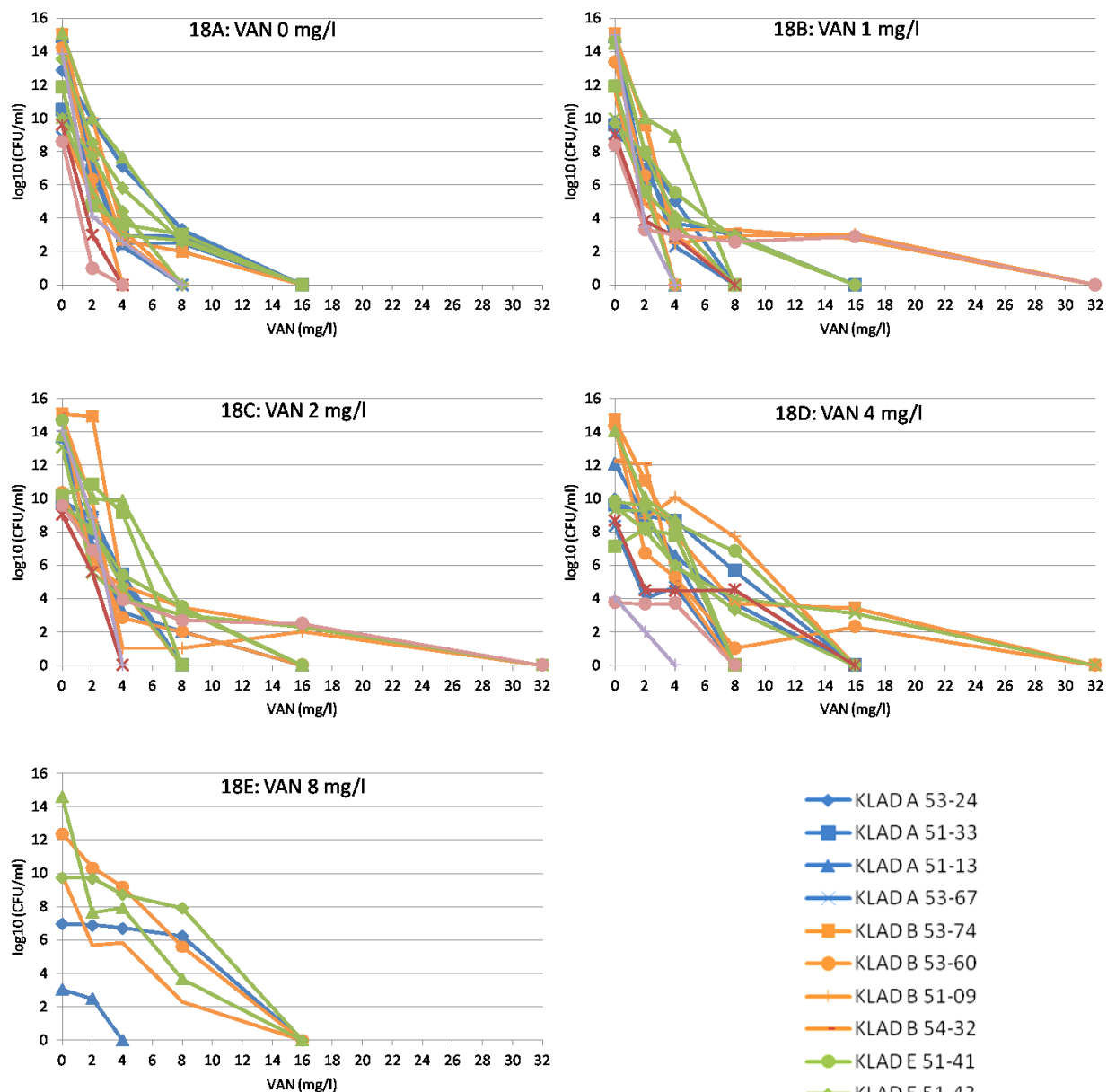
10B. Předchozí inkubace kmenů s vankomycinem taktéž snižovala citlivost k vankomycinu u všech kmenů, zatímco rezistentní mutanty byly spolehlivě selektovány pouze u 5 kmenů, viz tabulka 10A. Koncentrace vankomycinu použitá pro preinkubaci kmenů, která selektovala rezistenci jak k teikoplaninu, tak k vankomycinu u nejvíce kmenů, je 4 mg/l.

10A	skupina	kmen	poč. MIC	selekční tlak v tekutém médiu: VAN (mg/l)						
				0	1	2	4	8	16	
medián MIC (VAN) pro dané mutantní kmeny	KLAD A	53-24	1	2	2	2	2	4		
		51-33	0,5	2	2	2	2	2		
		51-13	0,5	1	1	1	8	2		
		53-67	0,25	1	1	1	1	1		
	KLAD B	53-74	0,5	0,5	1	0,5	8			
		53-60	0,5	2	2	2	4	8	2	
		51-09	0,5	2	2	2	4			
		54-32	0,5	4	2	2	4	4		
	KLAD E	51-41	1	8	4	4	8			
		51-43	1	2	2	2	4	4		
		54-45	0,25	1	2	2	4			
		54-52	0,5	2	4	4				
		51-58	2	2	2	2	4			
	KOMUN.	57-61	0,25	0,5	0,5	0,5	8			
		58-04	0,25	1	2	2	4			
		57-15	0,25	2	2	2	1			
	10B	skupina	kmen	poč. MIC	selekční tlak v tekutém médiu: VAN (mg/l)					
					0	1	2	4	8	16
	medián MIC (TEC) pro dané mutantní kmeny	KLAD A	53-24	8	16	16	16	16	16	
			51-33	2	4	32	32	32		
51-13			2	2	2	1	64	4		
53-67			1	1	0,5	1	0,5	0,5		
KLAD B		53-74	4	16	32	4	64			
		53-60	2	16	16	32	32			
		51-09	8	4	4	16	16			
		54-32	2	32	8	32	32	32		
KLAD E		51-41	4	64	32	16	32			
		51-43	8	16	16	16	32	32		
		54-45	2	8	8	16	32			
		54-52	1	2	2	2	32			
		51-58	8	8	16	32	32			
KOMUN.		57-61	4	4	4	4	64			
		58-04	2	4	8	16	8			
		57-15	1	16	4	16	4			

Tab. 10A, B – Změny MIC k vankomycinu (10A) a teikoplaninu (10B) po selekci v tekutém médiu o různých koncentracích vankomycinu. Kmeny byly v rámci jedнокrokové selekce s vyšším selekčním tlakem předem inkubovány v médiu bez antibiotika, nebo s VAN o koncentracích 1; 2; 4; 8; 16 mg/l a následně vysety na misky se zvyšující se koncentrací vankomycinu. Zobrazené hodnoty jsou mediánem z MIC 5 testovaných kolonií odebraných z misek s nejvyšší koncentrací vankomycinu, na kterých daný kmen ještě rostl.

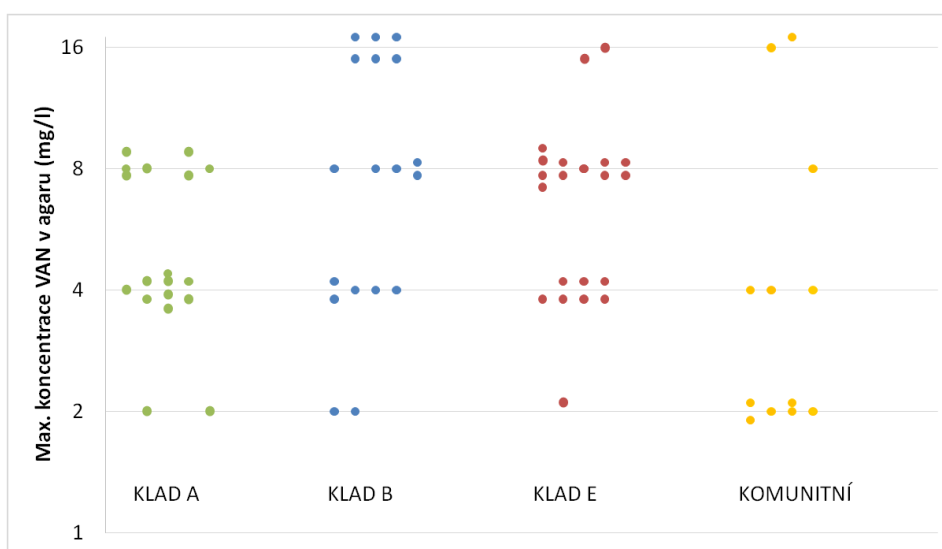
Počty CFU/ml jsem vynesla jako dekadický logaritmus oproti koncentraci daného antibiotika do grafu. Výsledné křivky zobrazují profil populační analýzy daného kmene při působení selekčního tlaku v podobě antibiotika. Umožňují porovnávat schopnost kmenů přežít selekční tlak v rámci geneticky příbuzných kladů a také kladů mezi sebou. Můžeme také posoudit, zda mají kmeny jednoho kladu podobný charakter růstu. Z toho posléze predikovat, jestli dojde k rezistenci akumulací obdobných mutací, a tudíž, jestli v rámci kladů existuje určitá genetická predispozice k vývoji rezistence.

Všech 16 kmenů *S. haemolyticus* v tekutém médiu bez přídavku antibiotika (viz obr. 18A) rostlo a při výsevu na misky byly kolonie detekovány na pevném médiu s maximální koncentrací vankomycinu 8 mg/l. Tři ze čtyř klinických izolátů kladu A (neroste 53-67), čtyři z pěti izolátů kladu E (neroste 51-43) a jeden ze čtyř kmenů kladu B (53-74) jsou schopny růst na miskách s pevným médiem o koncentraci vankomycinu rovné 8 mg/l. Komunitní izoláty nebyly schopny růst na miskách s pevným médiem o koncentraci VAN vyšší než 4 mg/l. Po kultivaci v tekutém médiu o koncentraci vankomycinu 1 mg/l (viz obr. 18B) jsou již tři kmeny (51-09 a 54-32 z kladu B a komunitní izolát 58-04) schopny růst na miskách s pevným médiem o koncentraci vankomycinu 16 mg/l. Kmeny 51-33 z kladu A a 51-41 z kladu E stále rostou na pevném médiu s koncentrací vankomycinu 8 mg/l. Kmeny 51-09 a 54-32 z kladu B a komunitní izolát 58-04 si po kultivaci v tekutém médiu s přídavkem vankomycinu o výsledné koncentraci 2 mg/l (viz obr. 18C) stále zachovávají schopnost růst na pevném médiu s koncentrací VAN 16 mg/l. Na této koncentraci nově roste i kmen 51-58 z kladu E a kmen 53-60 z kladu A nově vykazuje růst na pevném médiu o koncentraci 8 mg/l. Při koncentraci 4 mg/l vankomycinu použité pro kultivaci bakterií v tekutém médiu (viz obr. 18D) se snížil počet CFU/ml pouze u dvou kmenů, a to u kmene 53-60 z kladu B a komunitního izolátu 57-61. U kmenů, které byly schopné růst v tekutém médiu o koncentraci vankomycinu rovné 8 mg/l (viz obr. 18E) se dále nezvyšoval počet CFU/ml. U několika kmenů, které zde byly schopny růst, naopak tato koncentrace působila snížení počtu vyrostlých kolonií na misce (51-13 z kladu A a 53-60 z kladu B). Kmen 53-60 z kladu B jako jediný rostl i v tekutém médiu o koncentraci vankomycinu 16 mg/l, avšak po vyšetí na misky bylo detekováno jen malé množství CFU/ml na miskách s pevným médiem bez přídavku antibiotika a s přídavkem 2mg/l VAN, proto již graf PAP neuvádím.



Obr. 18A – E. - Populační analýza kmenů z jednotlivých geneticky příbuzných kladů (A, B, E) a nepříbuzných komunitních izolátů. Kmeny jednoho kladu jsou označeny stejnou barvou, komunitní izoláty jinými barvami. Grafy zobrazují populační analýzu růstu kmenů po předchozí inkubaci v tekutém médiu s přidavkem určité koncentrace vankomycinu. Na ose y jsou udány logaritmované hodnoty CFU (\log_{10}). Na ose x jsou vyneseny koncentrace vankomycinu na miskách, na kterých kmeny rostly.

Vidíme i postupný vývoj rezistence při zvyšování selekčního tlaku (inkubace ve zvyšujících se koncentracích vankomycinu), viz obrázek č. 19. Tečky představují kmeny dané skupiny (počet kmenů od dané skupiny viz tabulka č. 8), které jsou schopné růst na miskách o maximální koncentraci vankomycinu uvedené na ose y. Schopnost kmenů růst na čím dál vyšších koncentracích je podmíněna preinkubací se zvyšujícími se koncentracemi VAN (viz tabulka č. 10). Kmeny kladu B a E nejvíce odolávají selekčnímu tlaku vankomycinu, díky tomu nejčastěji rostou na nejvyšších koncentracích vankomycinu (8 a 16 mg/l).

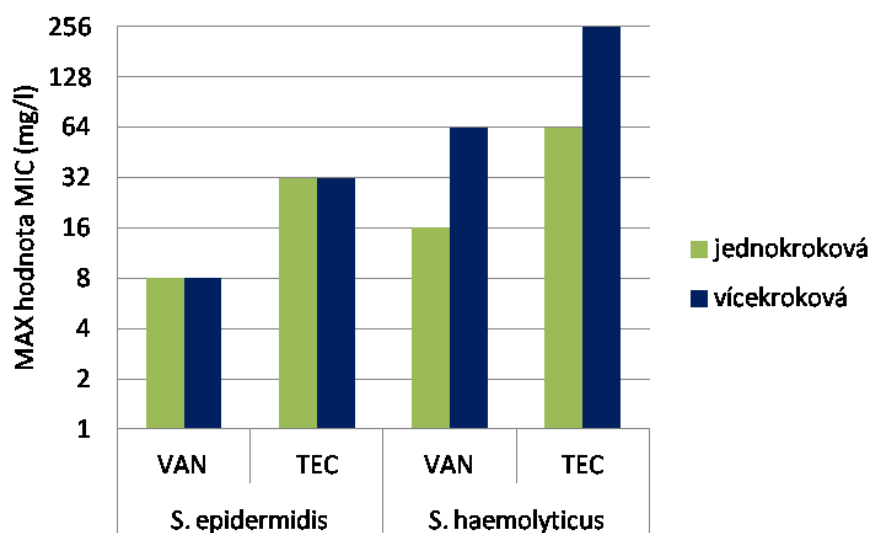


Obr. 19 – Schopnost kmenů daných skupin (kladů A, B, E a komunitní) odolávat selekčnímu tlaku antibiotika. Tečky zobrazují kmeny dané skupiny (zelená: klad A, modrá: klad B, červená: klad E, žlutá: komunitní) schopné růstu na miskách s maximální koncentrací vankomycinu uvedenou na ose y (po preinkubaci v médiu se zvyšujícími se koncentracemi VAN).

Při testování PAP a následném určení MIC mikrodiluční metodou u vybraných kolonií *S. haemolyticus*, pozorujeme zajímavý fenomén. Zřídka kdy totiž výsledná MIC kmene odpovídá koncentraci antibiotika v agaru, na kterém kmen roste, i přesto, že by měla být dvakrát vyšší. Na miskách s pevným médiem s koncentracemi vankomycinu 4; 8; 16 mg/l by měly růst pouze kmeny rezistentní s minimálními MIC 8; 16; 32 mg/l, respektive. Celkově bylo vybráno 325 kolonií z misek, na kterých by měly růst již jen rezistentní kmeny. Kolonie vyrostlé na miskách s přídatkem vankomycinu 4 mg/l však vykazovaly pouze v 16 % případů MIC ≥ 4 mg/l. Obdobně při testování MIC kolonií odebraných z misek s koncentrací VAN 8 mg/l, pouze 13 % odpovídalo MIC ≥ 8 mg/l. Ze 63 kolonií narostlých na agarech o koncentraci VAN 16 mg/l, pouze 1 kolonie měla MIC rovnou 16.

5.3 Porovnání účinnosti jednokrokové a vícekové selekce

Paralelně s jednokrokovou selekcí byla na stejných kmenech provedena Mgr. Vladimírem Vimbergem, PhD. i víceková selekce VAN/TEC rezistentních mutant. Rozdíl mezi vícekovou a jednokrokovou selekcí spočívá v tom, že kmeny se již od začátku kultivují v tekutém médiu s přidavkem antibiotika a pro další krok selekce se vždy vybírá kolonie s nejvyšší dosaženou MIC. Tím pádem mají bakterie více prostoru k akumulaci a optimalizaci mutací a měly by dosáhnout vyšších hladin rezistence. Zde uvádím pouze porovnání *jednoduché jednokrokové a vícekové selekce s výběrem kolonie s nejvyšší MIC* u *S. epidermidis* a *S. haemolyticus*, na základě toho, jaké maximální hodnoty MIC k VAN/TEC byly dosaženy. Z grafu na obrázku č. 20 je patrné, že u *S. epidermidis* docházelo nezávisle na typu selekce k izolaci mutant se shodnou maximální hodnotou MIC k vankomycinu, a stejně tak i k teikoplaninu. Tudíž lze tvrdit, že víceková selekce nevedla u *S. epidermidis* ke vzniku mutant s vyšší hladinou rezistence. Naproti tomu při selekci VAN/TEC rezistentních mutant u *S. haemolyticus* byla účinnější víceková selekce, kdy docházelo až k šestinásobnému zvýšení MIC oproti jednokrokové selekci. Obecně pro oba druhy bakterií platí, že dosažené MIC k teikoplaninu byly vždy minimálně čtyřnásobně vyšší, než k vankomycinu.



Obr. 20 - Maximální hladina rezistence k VAN a TEC naměřená u rezistentních mutant izolovaných v rámci jednokrokové a vícekové selekce.

5.4 Studium vzniku zkřížené rezistence glykopeptidových a neglykopeptidových antibiotik

V souvislosti se studiem mechanismu vzniku rezistence ke glykopeptidovým antibiotikům (VAN, TEC) nás zajímalo, zdali při užívání neglykopeptidových antibiotik nemůže docházet ke vzniku zkřížené rezistence ke glykopeptidovým antibiotikům a naopak. Testovali jsme β -laktamové antibiotikum imipenem a rifamycinové antibiotikum rifampicin, u kterých byl vznik zkřížené rezistence ke glykopeptidům popsán již dříve u *S. aureus* (Katayama et al. 2009; Matsuo et al. 2011).

Imipenem se využívá k léčbě závažnějších infekcí, převážně nozokomiálních pneumonií, vnitrobřišních infekcí a sepsí. V kombinaci s jinými antibiotiky je indikován k terapii infekcí způsobených multirezistentními patogeny (Rodloff et al. 2006). Synergistický efekt vankomycinu a imipenemu při léčbě infekcí vyvolaných meticilin rezistentními stafylokoky byl prokázán jak *in vitro* (Rochon-Edouard et al. 2000), tak *in vivo* (Benquan et al. 2002).

Rifampicin dokáže výborně pronikat biofilmem, proto se využívá k léčbě infekcí spojených s tvorbou biofilmu, které jsou často vyvolány CoNS. Avšak nemá při monoterapii baktericidní efekt. Proto se musí kombinovat s jiným antibiotikem, aby jejich současné působení mělo baktericidní účinky (Uckay et al. 2009). V kombinaci s vankomycinem je využíván k léčbě infekcí kloubních náhrad, vyvolaných methicilin-citlivým *S. aureus*, nebo koaguláza-negativními stafylokoky vyvolaných infekcí náhrad srdeční chlopně. Prokázaly se i jeho pozitivní účinky v kombinaci s vankomycinem na léčbu bakteriémie, zejména u předčasně narozených dětí (Rodriguez-Guerineau et al. 2013).

5.4.1 Vznik zkřížené rezistence ke glykopeptidům při selekci rezistence k imipenemu a rifampicinu

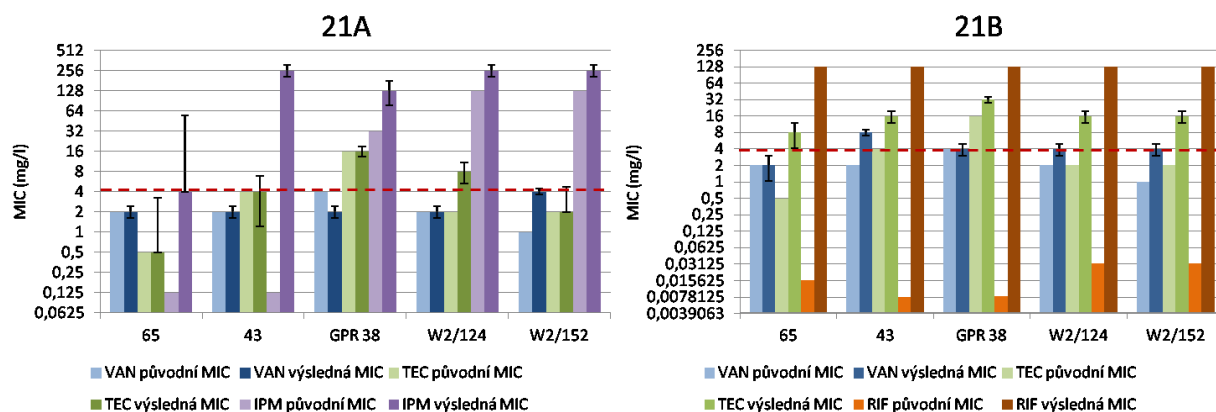
Pro testování vzniku zkřížené rezistence ke glykopeptidům po inkubaci s IPM/RIF jsme zvolili 5 kmenů CoNS (viz Tab. 11).

Kmeny W2/124 a W2/152 *S. haemolyticus* byly izolovány z infekčních materiálů intenzivní jednotky

neonatologického oddělení polské nemocnice (Brzychczy-Wloch, 2013). U kmene 65, u něž jsme předpokládali, že se jedná o citlivý kmen *S. epidermidis*, následná sekvenční analýza (která proběhla až po selekci) ukázala, že jde o *Staphylococcus pasteurii*. K selekci rezistentních klonů jsem využívala metodu *více krokové selekce na základě celé populace* (viz kapitola 4.2.3.3). Kmeny byly kultivovány v BHI médiu vždy 24 hodin, s dvojnásobně se zvyšujícími koncentracemi antibiotik (IPM a RIF), počínaje subinhibiční koncentrací, do koncentrace, ve které byly schopny růst. Bakterie rostoucí v médiu s nejvyšší koncentrací antibiotik byly vysety na misky s přídávkem VAN (0 - 16 mg/l) a TEC (0 – 32 mg/l) a u 5 kolonií, rostoucích na miskách o nejvyšší koncentraci VAN/TEC byla testována citlivost k VAN, TEC, RIF a IPM mikrodiluční metodou

druh	kmen	skupina	původní MIC (mg/l)			
			VAN	TEC	IPM	RIF
<i>S. epidermidis</i>	43	PG4	2	4	0,064	0,016
	GPR38	PG10	4	16	32	0,008
<i>S. haemolyticus</i>	W2/124		2	2	128	0,032
	W2/152		1	2	128	0,032
<i>S. pasteurii</i>	65		2	0,5	0,064	0,008

Tab. 11 – Vybrané rodičovské kmeny pro testování vzniku zkřížené rezistence ke glykopeptidům po inkubaci s IPM/RIF



Obr. 21A, B - Vliv imipenemu (21A) a rifampicinu (21B) na vznik zkřížené rezistence ke glykopeptidům. Výsledná MIC je vždy mediánem z 5 naměřených MIC. Červenou přerušovanou čarou je znázorněna hladina rezistence ke glykopeptidům pro CNS.

Kultivací ve zvyšující se koncentraci imipenemu se příliš nemění citlivost k vankomycinu a teikoplaninu (viz Obr. 21A). U zástupce druhu *S. pasteurii* (kmen 65) se minimální inhibiční koncentrace k vankomycinu i teikoplaninu nezměnila. Stejně tomu bylo i u kmene 43 druhu *S. epidermidis*, a u kmene GPR38 téhož druhu se MIC k vankomycinu dokonce snížila. Pouze u kmenů druhu *S. haemolyticus* došlo ke zvýšení minimální inhibiční koncentrace ke glykopeptidům po inkubaci s imipenemem. Konkrétně u kmene W2/152 došlo ke čtyřnásobnému zvýšení MIC k vankomycinu, i když nepřekročila hladinu rezistence. Pouze u kmene W2/124 pak došlo k selekci teikoplanin rezistentních mutantů po čtyřnásobném zvýšení MIC. Inkubace ve zvyšujících se koncentracích imipenemu vede pouze ojediněle k selekci zkřížené rezistence ke glykopeptidům. V tomto případě vznikaly teikoplanin rezistentní kmeny pouze u kmene W2/124 a je nutné také zmínit, že tento kmen byl již původně rezistentní k imipenemu (viz tabulka č. 12). Citlivost k vankomycinu se po inkubaci ve zvyšujících se koncentracích imipenemu zvýšila 4x u kmene W2/152, který ovšem také byl původně rezistentní k imipenemu. U obou kmenů došlo v průběhu selekce ještě k dvojnásobnému zvýšení rezistence k imipenemu. Tudíž změna citlivosti ke glykopeptidům po inkubaci s imipenemem byla pozorována pouze u kmenů druhu *S. haemolyticus*, které byly již původně rezistentní k imipenemu.

MIC k imipenemu se zvýšila u všech kmenů. U původně rezistentních kmenů: 2 izolátů *S. haemolyticus* se MIC k IPM zvýšila dvakrát a jednoho kmene *S. epidermidis* (GPR38) čtyřikrát (viz tabulka č. 12). K 4 000 násobnému nárůstu rezistence došlo u původně citlivého kmene 43 *S. epidermidis*. Rezistence k imipenemu nevznikla pouze u kmene *S. pasteurii*.

Po kultivaci kmenů ve zvyšující se koncentraci rifampicinu pozorujeme u všech testovaných kmenů nejméně dvojnásobný nárůst minimální inhibiční koncentrace k teikoplaninu, viz graf na obr. 21B. U kmene 65 druhu *S. pasteurii* došlo k osminásobnému zvýšení MIC k teikoplaninu, avšak MIC k vankomycinu se nezměnila. U kmene 43 druhu *S. epidermidis* se jak MIC k vankomycinu, tak i k teikoplaninu zvýšila 4 krát. Kmen GPR38 stejného druhu byl již původně rezistentní k teikoplaninu, ale jeho MIC se ještě 2 krát zvýšila, MIC vankomycinu se nezměnila (viz tabulka č. 12). U kmenů druhu *S. haemolyticus* došlo k nárůstu jak MIC vankomycinu (2 – 4 krát), tak teikoplaninu (6 krát), i když pouze MIC teikoplaninu dosáhla rezistenčních hodnot. Z tohoto experimentu je patrné, že inkubace kmenů koaguláza-negativních stafylokoků ve zvyšujících se koncentracích rifampicinu vede ke vzniku zkřížené rezistence k teikoplaninu a taktéž může indukovat změnu citlivosti k vankomycinu. selekcí na rifampicinu došlo ke vzniku rezistence k tomu antibiotiku u všech kmenů, přičemž citlivost se snížila více než 4 000 krát (viz tabulka č. 12).

Vliv imipenemu na selekci rezistence k vankomycinu							
druh CoNS	skupina	kmen	pův.MIC (IPM)	pův.MIC (VAN)	medián MIC po selekci		inkubace s xMIC IPM
					MIC (VAN)	MIC (IPM)	
<i>S. pasteurii</i>	citlivá	65	0,064	2	2	4	1x
<i>S. epidermidis</i>	PG4	43	0,064	2	2	128	1024x
	PG10	GPR38	32	4	2	128	1x
<i>S. haemolyticus</i>		W2/124	128	2	2	>256	1x
		W2/152	128	1	4	256	2x

Vliv imipenemu na selekci rezistence k teikoplaninu							
druh CoNS	skupina	kmen	pův.MIC (IPM)	pův.MIC (TEC)	medián MIC po selekci		inkubace s xMIC IPM
					MIC (VAN)	MIC (IPM)	
<i>S. pasteurii</i>	citlivá	65	0,064	0,5	0,5	4	1/2x
<i>S. epidermidis</i>	PG4	43	0,064	4	4	256	1024x
	PG10	GPR38	32	16	16	128	2x
<i>S. haemolyticus</i>		W2/124	128	2	8	>256	1x
		W2/152	128	2	2	>256	2x

Vliv rifampicinu na selekci rezistence k vankomycinu							
druh CoNS	skupina	kmen	pův.MIC (RIF)	pův.MIC (VAN)	medián MIC po selekci		inkubace s xMIC RIF
					MIC (VAN)	MIC (RIF)	
<i>S. pasteurii</i>	citlivá	65	0,008	2	2	>128	2048x
<i>S. epidermidis</i>	PG4	43	0,016	2	8	>128	2048x
	PG10	GPR38	0,008	4	4	>128	1024x
<i>S. haemolyticus</i>		W2/124	0,032	2	4	>128	2048x
		W2/152	0,032	1	4	>128	2048x

Vliv rifampicinu na selekci rezistence k teikoplaninu							
druh CoNS	skupina	kmen	pův.MIC (RIF)	pův.MIC (TEC)	medián MIC po selekci		inkubace s xMIC RIF
					MIC (VAN)	MIC (RIF)	
<i>S. pasteurii</i>	citlivá	65	0,008	0,5	8	>128	2048x
<i>S. epidermidis</i>	PG4	43	0,016	4	16	>128	2048x
	PG10	GPR38	0,008	16	32	>128	1024x
<i>S. haemolyticus</i>		W2/124	0,032	2	16	>128	2048x
		W2/152	0,032	2	16	>128	1024x

Tab. 12 - Výsledné hodnoty MIC po selekci rezistence k VAN a TEC působením selekčního tlaku imipenemu či rifampicinu. Medián je vypočten vždy z 5 naměřených MIC. V posledním sloupci je uveden násobek MIC k IPM/RIF, při inkubaci v tekutém médiu.

5.4.2 Vznik zkřížené rezistence k imipenemu při selekci rezistence k vankomycinu

Zároveň jsme chtěli otestovat, jaký má vliv nově vzniklá rezistence ke glykopeptidům (konkrétně k vankomycinu) na selekci zkřížené rezistence k imipenemu. Pro tento experiment jsem používala mutantní kmeny *S. haemolyticus* (viz Tab. 13), u kterých byla vyselektována rezistence k vankomycinu, nebo se jejich MIC (VAN) zvýšila 16x a více. Zároveň tyto kmeny musely splňovat podmínku, aby rodičovské kmeny, ze kterých byly selektovány, nebyly rezistentní

skupina	kmen	původní MIC (mg/l)	
		VAN	IPM
KLAD A	51-13	0,5	0,25
	53-60	0,5	1
KLAD B	54-32	0,5	8
	53-74	0,5	8
	51-41	1	0,25
KLAD E	54-45	0,25	0,5
	54-52	0,5	0,125
	51-43	1	0,5
	51-58	2	1
	57-61	0,25	0,125
KOMUN.	58-04	0,25	0,125
	57-15	0,25	0,125

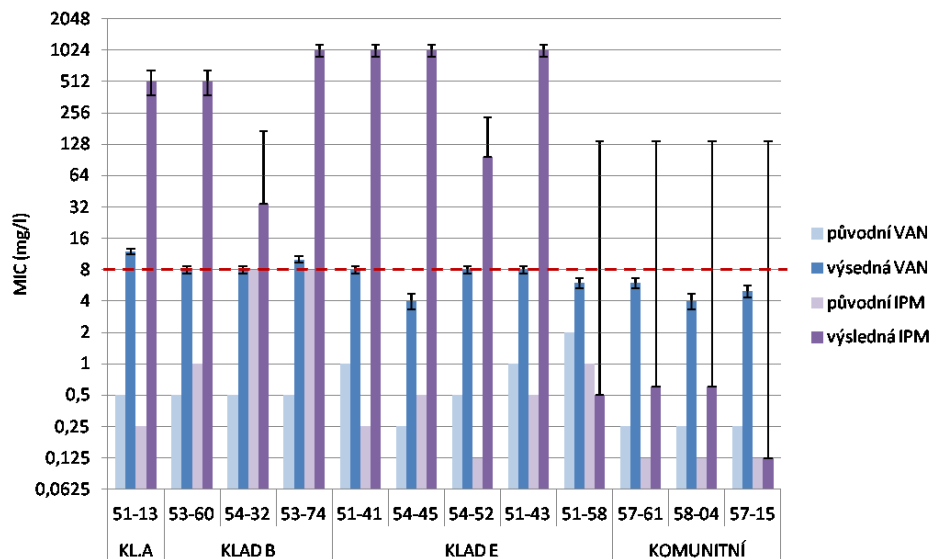
k imipenemu. Bohužel standardy EUCAST neuvádějí

minimální inhibiční koncentraci k imipenemu pro stafylokoky, ale například u enterokoků, či *Pseudomonas aeruginosa* se hladina rezistence uvádí jako hodnota větší než 8 mg/l. Ve svém

experimentu tedy považuji kmeny CoNS za rezistentní při naměřené hodnotě MIC vyšší než 8 mg/l. U těchto kmenů jsem testovala mikrodiluční metodou změnu citlivosti k imipenemu po selekci rezistence či velké změně citlivosti k vankomycinu a porovnávala jsem jejich citlivost k IPM s citlivostí kmenů rodičovských.

Vliv vzniku rezistence ke glykopeptidům na vznik zkřížené rezistence k rifampicinu byl již v naší laboratoři testován u kmenů *S. epidermidis* a ukázalo se, že při selekci rezistence ke glykopeptidům zároveň nevzniká rezistence k rifampicinu (výsledky nejsou součástí práce). Proto jsem již zkříženou rezistenci k rifampicinu netestovala.

Tab. 13 - Vybrané kmeny *S. haemolyticus* pro selekci zkřížené rezistence k imipenemu. Zařazené do jednotlivých kladů, s uvedenou původní minimální inhibiční koncentrací k vankomycinu a imipenemu.



Obr. 22 – Vliv vankomycinu na vznik zkřížené rezistence k imipenemu. Výsledné MIC jsou mediánem vždy ze 4 vzorků daného kmene *S. haemolyticus*. Červenou přerušovanou čarou je znázorněna hladina rezistence k imipenemu.

Po kultivaci ve zvyšujících se koncentracích vankomycinu dochází ke změně citlivosti k imipenemu u kmenů *S. haemolyticus* (viz graf na Obr. 22). Téměř u všech klinických izolátů (klady A, B, E) vzniká zkřížená rezistence k imipenemu zvýšením jeho MIC 4 – 24 krát. U komunitních izolátů a klinického kmene 51-58 nedochází k selekci zkřížené rezistence k imipenemu. U nepříbuzných komunitních kmenů 57-61 a 58-04 se MIC (IPM) zvyšuje více než 4 krát, zatímco u kmene 57-15 se nemění. U klinického izolátu 51-58 dokonce došlo ke dvojnásobnému snížení MIC k imipenemu.

5.5 Fenotypová analýza

S cílem lépe charakterizovat selektované mutantní kmeny se sníženou citlivostí ke glykopeptidům, které byly vybrány k sekvenaci, jsme testovali, zdali se u nich změnila schopnost tvořit biofilm.

5.5.1 Produkce biofilmu

Produkce biofilmu byla testována u 16 rodičovských kmenů *S. haemolyticus* a u 64 příslušných mutantů vykazujících sníženou citlivost k vankomycinu (od každého kmene 4), viz tabulka 14B.

Dále u 3 rodičovských kmenů *S. epidermidis* (GPR38, 43, 65) a u 10 příslušných rezistentních mutantů, viz Tab. 14A. Schopnost bakterií tvořit biofilm jsem testovala ve 3 experimentálních podmínkách:

a) v TSB médiu s přidavkem 1% glukózy, b) v TSB s 1% glukózou a subinhibiční koncentrací vankomycinu a za c) v TSB s 1% glukózou se subinhibiční koncentrací teikoplaninu. Některé změny fenotypu mohou být patrné teprve po přidání antibiotika, protože až antibiotikum vyvolá expresi příslušného mutovaného genu. Z toho důvodu jsme přidávali i subinhibiční koncentrace VAN a TEC.

		OD ₆₃₀	biofilm	
		> 0,240	silný	
		0,120 - 0,240	středně silný	
		0,100 - 0,119	slabý	
		< 0,100	žádný	

RODIČOVSKÉ KMENY <i>S. epidermidis</i> a <i>S. pasteurii</i>				
skupina	kmen	TSBgl	TSBgl+VAN	TSBgl+TEC
PG10	GPR38	0,100	0,080	0,060
PG4	43	0,080	0,060	0,070
	65	0,090	0,060	0,080
MUTANTNÍ KMENY <i>S. epidermidis</i> a <i>S. pasteurii</i>				
PG10	G38RVc1	0,025	0,009	0,004
	G38RVd1	0,019	0,002	0,011
	G38RTc2	0,010	0,004	0,006
	G38ITc1	0,013	0,004	0,006
PG4	43RVb1	0,032	0,028	0,052
	43RTd1	0,059	0,068	0,107
	43RVb2	0,082	0,075	0,096
	43RTb2	0,047	0,009	0,058
	43ITa1	0,138	0,044	0,037
	65RTe2	0,021	0,004	0,006

RODIČOVSKÉ KMENY <i>S. haemolyticus</i>				
	kmen	TSBgl	TSBgl+VAN	TSBgl+TEC
KLAD A	53-24	0,066	0,062	0,023
	51-33	0,249	0,286	0,215
	51-13	0,014	0,032	0,008
	53-67	0,073	0,095	0,051
KLAD B	53-60	0,004	0,003	0,001
	54-32	0,003	0,005	0,021
	53-74	0,026	0,035	0,006
	51-09	0,005	0,028	0,003
KLAD E	51-41	0,017	0,007	0,003
	54-45	0,001	0,008	0,000
	54-52	0,002	0,006	0,004
	51-43	0,014	0,028	0,010
KOMUNITNÍ	51-58	0,006	0,002	0,001
	57-61	0,001	0,004	0,003
	58-04	0,002	0,004	0,002
	57-15	0,001	0,005	0,007
MUTANTNÍ KMENY <i>S. haemolyticus</i>				
KLAD A	53-24 V1	0,050	0,057	0,045
	53-24 V2	0,056	0,034	0,033
	53-24 V3	0,003	0,001	0,033
	53-24 8d8	0,039	0,035	0,041
KLAD B	51-33 V1	0,199	0,113	0,090
	51-33 V2	0,118	0,044	0,063
	51-33 V3	0,106	0,020	0,040
	51-33 4e8	0,180	0,296	0,292
	51-13 V4.1	0,026	0,009	0,003
	51-13 8V4	0,024	0,011	0,010
	51-13 32V9	0,034	0,008	0,004
	51-13 4c8	0,008	0,003	0,003
	53-67 V2.3	0,043	0,051	0,024
	53-67 8V1(2)	0,005	0,000	0,006
	53-67 8V1(4)	0,005	0,001	0,004
	53-60 V1	0,005	0,002	0,001
	53-60 V2	0,006	0,005	0,002
	53-60 V3	0,004	0,003	0,008
	53-60 8a16	0,002	0,003	0,002
	54-32 V1	0,000	0,006	0,001
KLAD E	54-32 V2	0,000	0,006	0,004
	54-32 V3	0,002	0,004	0,003
	54-32 2c8	0,001	0,003	0,001
	53-74 V4.1	0,031	0,012	0,006
	53-74 8V2(1)	0,120	0,024	0,009
	53-74 8V2(4)	0,042	0,017	0,017
	53-74 4a16	0,019	0,000	0,007
	51-09 4V.1	0,003	0,002	0,002
	51-09 8V.5	0,019	0,002	0,001
	51-09 16V1	0,003	0,002	0,001
	51-09 2d8	0,034	0,002	0,002
	51-41 V2.1	0,016	0,015	0,009
	51-41 6V2	0,009	0,005	0,008
	51-41 8V1	0,012	0,007	0,014
	51-41 0a8	0,040	0,014	0,019
	KOMUNITNÍ	54-45 V2.3	0,005	0,000
54-45 4V1		0,002	0,003	0,002
54-45 8V2		0,002	0,004	0,002
54-45 0b4		0,001	0,003	0,000
54-52 V8.1		0,005	0,005	0,006
54-52 4V2		0,002	0,005	0,001
54-52 8V1		0,007	0,002	0,001
54-52 8c8		0,002	0,001	0,003
51-43 V8.2		0,014	0,010	0,007
51-43 8V2(1)		0,018	0,009	0,008
51-43 8V2(4)		0,020	0,011	0,007
51-43 4e8		0,024	0,039	0,015
51-58 V1		0,011	0,006	0,006
51-58 V2		0,003	0,003	0,004
51-58 V3		0,001	0,002	0,003
51-58 4d8		0,005	0,002	0,004
KOMUNITNÍ	57-61 V4.1	0,008	0,007	0,005
	57-61 8V2	0,104	0,007	0,010
	57-61 4V1	0,011	0,008	0,010
	57-61 4a8	0,003	0,004	0,003
	58-04 V1	0,007	0,006	0,005
	58-04 V2	0,005	0,009	0,000
	58-04 V3	0,002	0,013	0,000
	58-04 1a4	0,002	0,008	0,003
57-15 V1	0,002	0,007	0,001	
57-15 V2	0,000	0,012	0,004	
57-15 V3	0,003	0,009	0,004	
57-15 0c16	0,002	0,000	0,002	

Tab. 14A, B – Produkce biofilmu u kmenů *S. epidermidis*, *S. pasteurii* (14A) a *S. haemolyticus* (14B) na TSB médiu s 1% glukózou a na tomto médiu s přidavkem subinhibičních koncentrací VAN a TEC.

Pouze u jednoho rodičovského kmene *S. haemolyticus*, označeného 51-33, z 16 byla prokázána tvorba silného biofilmu, ve všech třech variantách testování. U 4 mutantních kmenů selektovaných z kmene 51-33 se schopnost tvořit biofilm dále nezlepšovala, spíše byla nižší nebo vymizela úplně. U jedné mutanty kmene 53-74 a jedné mutanty kmene 57-61 testovaných v TSB médiu bez přídavku antibiotika došlo k nabytí schopnosti tvořit slabý biofilm (viz 14B).

Rodičovský kmen GPR38 měl schopnost tvořit slabý biofilm na médiu bez antibiotika, ale 4 mutanty se sníženou citlivostí ke glykopeptidům, selektované z tohoto kmene, schopnost tvořit biofilm ztratily. Pouze 2 mutanty kmene 43, z nichž jedna byla selektovaná na imipenemu (a měla sníženou citlivost k teikoplaninu) a druhá selektovaná na rifampicinu (taktéž se sníženou citlivostí k TEC), získaly oproti rodičovskému kmeni schopnost tvořit slabý až středně silný biofilm (viz 14A).

5.5.2 Optimalizace protokolu na testování autolýzy

Nejprve bylo třeba optimalizovat protokol testování autolýzy na rodičovských kmenech stafylokoků, aby bylo možné autolýzu testovat i u mutantních kmenů a porovnat, zdali došlo v důsledku selekce rezistence ke glykopeptidům ke změně autolýzy. Autolýza byla testována u 9 rodičovských kmenů *S. haemolyticus* a kontrolního kmene *S. aureus* RN4220. Bylo problematické sledovat OD₆₀₀ u všech kmenů a zároveň zastavit růst přesně v rozmezí OD₆₀₀ 0,3 – 0,4; což je patrné z hodnot OD v tabulce č. 15 Správnost experimentu by měla potvrdit hodnota autolýzy kontrolního kmen *S. aureus* RN4220, která by měla dosahovat přibližně 70%. Z tabulky č. 15 vidíme, že nedosahuje ani polovičních hodnot. Vzhledem k nedostatku času však nebyl protokol optimalizován, a autolýza nebyla u mutantních kmenů nakonec měřena.

Kmen	Autolýza (%)	OD ₆₀₀
54-32	13,3	0,72
53-60	2,3	0,57
53-24	13,4	0,39
58-04	25,8	0,84
57-15	18,4	0,35
51-43	0,9	0,50
54-52	4,4	0,36
51-41	9,0	0,64
57-61	29,6	0,54
RN4220	34,2	1,20

Tab. 15 – Výsledky autolýzy u 9 kmenů *S. haemolyticus* a kontrolního kmene *S. aureus* RN4220 jednoho ze tří pokusů optimalizovat podmínky experimentu. Ve třetím sloupci je uvedeno OD₆₀₀, při kterém byl zastaven růst kultury.

5.6 Vývoj systému na ověření mutací udílejících rezistenci ke glykopeptidovým antibiotikům

Cílem bylo vytvořit systém, v němž by bylo možné, ověřit funkci mutací podmiňujících glykopeptidovou rezistenci u koaguláza-negativních stafylokoků. Z důvodu genetických bariér zahrnující restriktivně-modifikační systémy či CRISPR sekvence, které brání přijetí cizorodé DNA (Monk et al. 2012) není možné geneticky manipulovat CoNS. Rozhodli jsme se tedy testovat vliv mutovaných genů na rezistenční fenotyp v heterologním hostiteli *S. aureus*, u kterého je manipulace díky dostupným protokolům a systémům umožněna.

V naší laboratoři byly v předchozích letech analyzovány sekvence rezistentních mutant získaných selekcí klinického izolátu *S. haemolyticus* W2/124 na vankomycinu a teikoplaninu. Získané mutanty vykazovaly rezistenci pouze k teikoplaninu, a to nezávisle na tom, zda byly selektovány na teikoplaninu (mutanty TEC1 a TEC2), či vankomycinu (mutanty VAN1 a VAN2). Za 16 a 32 násobné snížení citlivosti k teikoplaninu způsobené selekcí na teikoplaninu u mutant TEC1 a TEC2 stála pouze jediná aminokyselinová záměna v proteinu VraS(Q289K). U teikoplanin rezistentní mutanty VAN1 selektované na vankomycinu byla identifikována také jedno aminokyselinová záměna, a to v proteinu VicK (V550L), avšak u mutanty VAN2 nalezena nebyla. Mutace VraS (Q289K) byla zároveň pomocí PCR identifikována i u dalších třech teikoplanin rezistentních mutant selektovaných na teikoplaninu. Avšak mutace VicK (V550L) již v žádných mutantních kmenech nalezena nebyla (Vimberg, 2018). Proto jsme si pro vývoj systému na ověření mutací vybrali mutaci VraS (Q289K).

5.6.1 Charakterizace a příprava systému na ověření mutací

Vliv aminokyselinové záměny VraS Q289K na rezistenci k teikoplaninu u *S. haemolyticus* byl již v naší laboratoři studován v heterologním hostiteli *S. aureus*, restriktivně defektním kmeni RN4220, do něž byly transformovány plazmidy nesoucí mutovanou variantu *vraS_{ShQ289K}* a nemutovanou variantu *vraS_{Sh}*. Následně byl porovnáván fenotyp a citlivost ke glykopeptidům u těchto dvou kmenů. Avšak kmen RN4220 obsahoval i vlastní variantu genu *vraS*, nesenou v genomu, což mohlo ovlivnit výsledky experimentu. Proto bylo třeba pro expresi mutovaného a nemutovaného genu *vraS* použít kmen, který by vlastní protein VraS neprodukoval. Jako adekvátní mutanty byly pro účely heterologní exprese mutovaných genů použity inzerční mutanty z NTML (The Nebraska Transposon

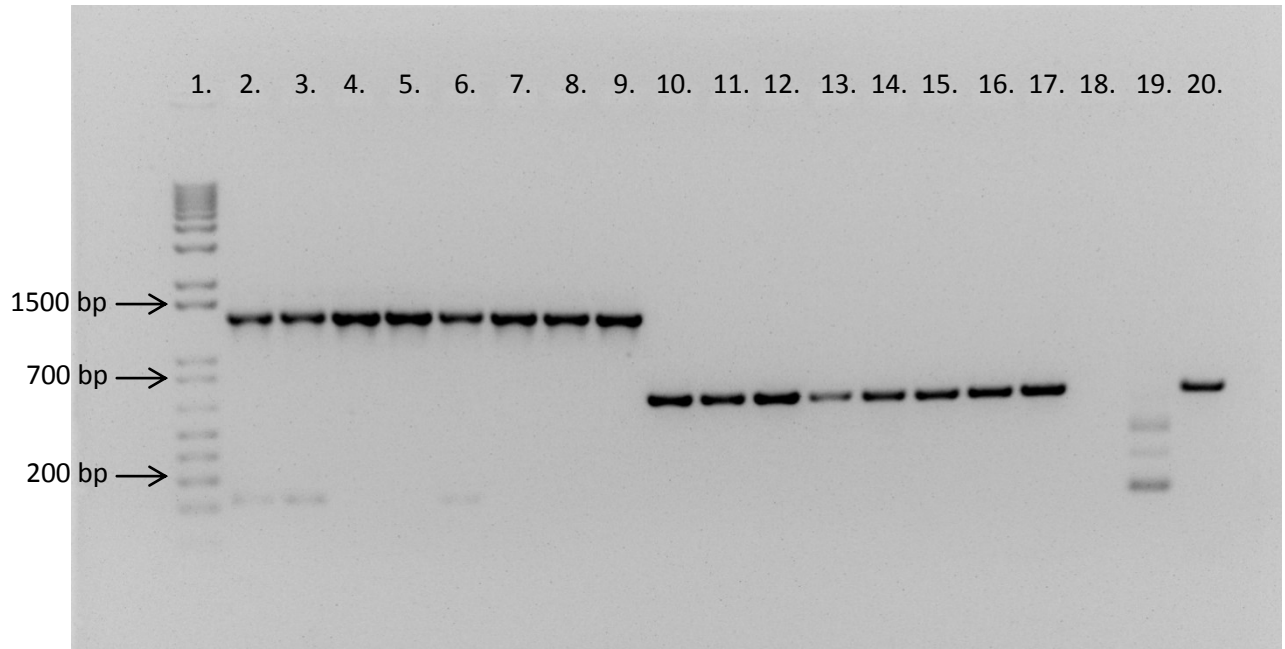
Mutant Library), v níž je evidováno 1920 kmenů vytvořených vkládáním transpozonové inserce vždy do jednoho z neesenciálních genů klinicky významného izolátu *S. aureus* USA300 (Fey et al. 2013). Kmen NE823 nese transpozonovou inserci v genu *vraS*, tudíž byl vhodným kmenem pro tvorbu systému na ověření mutace *VraS* (Q289K).

Pomocí metody modifikující plazmid je možné vkládat do kmenů *S. aureus* plazmidovou DNA, jejíž metylační vzor je nejprve upraven v kmeni *E. coli* IMOxxB, který heterologně exprimuje metyltransferázu hostitelského kmene. Tím je zajištěno vytvoření správného metylačního vzoru a zabráněno rozštěpení cizorodé DNA s nerozpoznatelným metylačním vzorem. Konkrétně jsem využívala kmen *E. coli* IMO8B, který je kompatibilní ke klinickému izolátu *S. aureus* USA300, od něž je odvozen kmen NE823 (Monk et al. 2015).

5.6.2 Transformace mutované a nemutované varianty *vraS* do kmene *Staphylococcus aureus* NE823

Pro klonování mutované (*vraS_{ShQ289K}*) a nemutované (*vraS_{Sh}*) varianty *vraS* byl vybrán vektor pRMC2. Geny kódující nemutovaný protein *VraS* (*vraS_{Sh}*) a mutovaný protein *VraS* (*vraS_{ShQ289K}*) z téhož kmene W2/124 *S. haemolyticus* Mgr. Vladimír Vimberg, PhD. amplifikoval pomocí PCR za použití primerů *VraS_F* a *VraS_R* a namnožené fragmenty následně vložil do vektoru pRMC2 v *HpaI* restrikčním místě. Takto připravené plazmidy pRMC2::*vraS_{ShQ289K}* a pRMC2::*vraS_{Sh}* a prázdný pRMC2 plazmid (sloužil jako kontrola) jsem nejprve pomnožila v *E. coli* JM109 pomocí transformace teplotním šokem (viz 4.2.4). A následně jsem z nich izolovala plazmidovou DNA. Poté jsem plazmidovou DNA transformovala teplotním šokem do kompetentních buněk IMO8B *E. coli*, aby získaly správný metylační vzor a následně jsem upravenou plazmidovou DNA z IMO8B izolovala (viz 4.2.5). Nakonec byly plazmidy přeneseny pomocí transformace elektroporací do kompetentních buněk *S. aureus* kmene NE823 (viz 4.2.4). Přítomnost plazmidu s vloženými variantami *vraS* a zároveň přítomnost transpozonové inserce v původním *vraS* jsem ověřovala pomocí koloniové PCR (viz 4.2.6) jednotlivých transformovaných kolonií vyrostlých na misce s chloramfenikolem (25µg/ml). Pro amplifikaci jsme použila dvojice primerů pRMC2_F a pRMC2_R (ověření plazmidu) a primery bursa *erm_R* a NE823_R (ověření přítomnosti Tn inserce). Koloniová PCR však byla opakovaně negativní a tak jsem přistoupila k izolaci genomové DNA. Následně jsem za pomoci standardní PCR (viz 4.2.6) ověřila přítomnost vložených variant *vraS* za použití primerů pro pRMC2 (pRMC2_F, pRMC2_R), viz Obr. 23.

Produkt o velikosti 1300 bp potvrdil přítomnost plazmidu. Primery bursa erm_R a NE823_R jsem použila k amplifikaci úseku s transpozonovou inzercí ve *vraS* kmene NE823. Vzniklý produkt o délce 681 bp přítomnost vloženého transpozonu potvrdil.



Obr. 23 - Kontrolní PCR. Ověřuje přítomnosti mutované (*vraS_{ShQ289K}*) a nemutované (*vraS_{Sh}*) varianty *vraS* vložených v pRMC2 a dále potvrzuje přítomnost transpozonu (Tn) inzertovaného ve *vraS* v kmeni NE823. Vzorky: 2. – 5., 10. – 13.: Mut *VraS_{ShQ289K}* v pRMC2, 6.– 9., 14. – 17.: WT *VraS_{Sh}* v pRMC2, vzorky 19. a 20. – pRMC2.

2. – 9.: **ověření přítomnosti *VraS* (*vraS_{ShQ289K}* a *vraS_{Sh}*), vloženého v pRMC2** (primery pRMC2 F a pRMC2 R) produkt dlouhý cca **1300 bp**

10. – 16., 18.: **ověření přítomnosti Tn mutanty**(primery bursa ermR a NE823 R) produkt dlouhý **681 bp**

17. – pouze pRMC2 bez *vraS*, produkt dlouhý **234 bp**

5.6.3 Testování vlivu mutované a nemutované varianty *VraS* na citlivost k VAN a TEC

Citlivost kmenů NE823 s vloženou mutovanou (*vraS_{ShQ289K}*) a nemutovanou (*vraS_{Sh}*) variantou *vraS* a kmene NE823 s vloženým prázdným vektorem pRMC2, který sloužil jako negativní kontrola, jsem testovala pomocí mikrodiluční metody. Přepis genů z promotoru pRMC2 byl indukován anhydratetrazyklinem (AnhTet) o výsledné koncentraci 100 ng/ml a erytromycin o koncentraci 10 µg/ml byl použit jako selekční marker pro kmen NE823 a chloramfenikol o koncentraci 25 µg/ml jako selekční marker pro plasmid. Byly testovány i varianty bez AnhTet, jak s erytromycinem, tak bez erytromycinu, které sloužily jako negativní

kontroly, u nichž nedocházelo k přepisu genů z pRMC2 promotoru. Varianta s AnhTet bez erytromycinu byla testována kvůli podezření, že by erytromycin mohl interagovat s glykopeptidovými antibiotiky a měnit tak výsledky testování citlivosti k těmto antibiotikům. Výsledky testování citlivostí jsou uvedeny v tabulce č. 16.

Kmen NE823 s plazmidy:	MIC (mg/l)							
	TEC				VAN			
	s ERY s AnhTet	s ERY	s AnhTet	bez ATB	s ERY s AnhTet	s ERY	s AnhTet	bez ATB
pRMC2	0,25	0,25	0,25	0,25	1	1	1	1
pRMC2::vraS _{Sh}	0,25	0,25	0,25	0,25	1	1	1	1
pRMC2::vraS _{ShQ289K}	0,5	0,25	0,25	0,25	1	1	1	1

Tab. 16 – Minimální inhibiční koncentrace k TEC a VAN kmenů *S. aureus* NE823 s vloženými variantami plazmidu pRMC2. AnhTet (100 ng/ml) slouží jako induktor přepisu genů z promotoru pRMC2 a erytromycin (10 µg/ml) jako selekční marker pro kmen NE823.

Naměřené hodnoty uvedené v tabulce č. 16 jsou výsledkem tří nezávislých experimentů. Citlivost k teikoplaninu se u kmene NE823 s vloženou mutovanou variantou *vraS* (*vraS_{ShQ289K}*) snížila pouze 2x, i když daná mutace v původním kmeni W2/124S. *haemolyticus* způsobila snížení citlivosti 16 – 32x. Toto mírné snížení citlivosti tedy nestačí k ověření funkčnosti systému založeného na *S. aureus*. Citlivost k vankomycinu se u kmene s mutovanou variantou *vraS* vůbec nelišila od citlivosti kmenů s nemutovanou variantou *vraS* či od kontrolního kmene s prázdným vektorem, což jsme však předpokládali, poněvadž tato mutace nezpůsobovala v původním kmeni W2/124 změnu citlivosti k vankomycinu.

Poté, co se testováním citlivosti mikrodiluční metodou nepotvrdila účinnost vytvořeného systému na ověření mutací, rozhodla jsem se vyzkoušet, jak by ovlivňovala exprese mutovaného a nemutovaného *vraS* citlivost ke glykopeptidům u jiných kmenů *S. aureus*. Vybrala jsem kmen RN4220, do kterého lze transformovat cizorodou DNA, poněvadž u něj chybí restriční systém, ale modifikační je zachován. Expres mutovaného *vraS* již v RN4220 byla testována u nás v laboratoři, kdy se citlivost k teikoplaninu snížila 4x. Tyto výsledky jsem chtěla také potvrdit. Dalším kmenem byl klinický izolát JE2, rodičovský kmen USA300 kmene, ze kterého je odvozen kmen NE823. Do těchto dvou kmenů byly elektroporací transformovány plazmidy pRMC2 s mutovanou a nemutovanou variantou *vraS* izolované z IMO8B. Úspěšně transformované buňky byly selektovány z agaru s přídavkem

chloramfenikolu (25 µg/ml). Kmeny s vloženými mutovanými (*vraS_{ShQ289K}*) a nemutovanými variantami (*vraS_{ShQ289K}*) *vraS* jsem testovala pomocí metody E-testu na citlivost k vankomycinu a teikoplaninu. Jako induktor exprese genů z pRMC2 promotoru jsem přidávala AnhTet v koncentraci 100 ng/ml a pro kontrolu byly stejné kmeny testovány bez přidání AnhTet. Pro lepší orientaci ve výsledcích jsem naměřené hodnoty porovnávala tím způsobem, že jsem vždy vypočítala podíl minimální inhibiční koncentrace naměřené u kmene s mutovanou a nemutovanou variantou *vraS*.

		podíl MIC MUT (<i>vraS_{ShQ289K}</i>)/WT(<i>vraS_{Sh}</i>)			
		AnhTet		bez AnhTet	
Kmen <i>S. aureus</i>	specifikace	VAN	TEC	VAN	TEC
JE2	klinický izolát, rodičovský kmen USA300	1,7	1,8	0,71	1
RN4220	laboratorní kmen	1,7	0,6	1	1,2
NE823	USA300 s vloženým Tn ve <i>vraS</i>	1	2,3	1	1,2

Tab. 17 – Poměry minimálních inhibičních koncentrací 3 kmenů *S. aureus* s vloženými plazmidy pRMC2 s mutovanými (MUT) a nemutovanými (WT) variantami genu *vraS*. MIC byly testovány E-testem. Anhydrotetracyklin (AnhTet) je induktorem promotoru pRMC2. Varianta bez AnhTet slouží jako negativní kontrola.

Porovnáním podílu MIC kmenů s mutovanou a nemutovanou variantou *vraS* u AnhTet indukovaných kmenů a kontrol bez přídavku induktoru exprese (viz tabulka č. 17) můžeme zjistit, jaký má mutace *VraS* Q289K vliv na citlivost ke glykopeptidům u těchto testovaných kmenů. U kmene RN4220 se nepotvrdilo čtyřnásobné zvýšení MIC k teikoplaninu, minimální inhibiční koncentrace k teikoplaninu se u mutovaného kmene dokonce snížila. Nárůst MIC k teikoplaninu na téměř dvojnásobek pozorujeme u kmene JE2 a více, než dvojnásobek u kmene NE823, což potvrzuje předchozí výsledky testování citlivosti mikrodiluční metodou. Pokud ale porovnáme změnu citlivosti k teikoplaninu u kmene JE2, který má vlastní variantu genu *vraS* přítomnou v genomu, se změnou citlivosti u kmene NE823, u něž je *vraS* inaktivován inzercí transpozonu, nevidíme markantní rozdíl. Podle naší hypotézy by se mutovaná varianta genu *vraS* měla projevat v kmeni NE823 významněji, vzhledem k tomu, že u původního kmene W2/124 *S. haemolyticus* způsobovala 16 – 32 násobný nárůst MIC k teikoplaninu. Je zajímavé, že MIC k vankomycinu, se u kmenů JE2 a RN4220 s vloženou mutovanou variantou *vraS* mírně zvyšuje, zatímco u kmene NE823 se vůbec nemění.

6 Diskuze

Tato práce měla za cíl popsat vznik rezistence ke glykopeptidům u koaguláza-negativních stafylokoků. Pracovali jsme se sbírkou klinických izolátů *Staphylococcus epidermidis* z českých nemocnic, u nichž byla již stanovena klonální příbuznost pomocí PFGE a taktéž citlivost k VAN a TEC. Znalost klonální příbuznosti byla výhodou, poněvadž jsme mohli vybrat vždy několik kmenů stejné klonality, ale s rozdílnou citlivostí ke glykopeptidům. Porovnáním vývoje rezistence u příbuzných izolátů bylo možné ověřit, zdali je mechanismus rezistence geneticky podmíněný. 11 kmenů *S. epidermidis* vybraných pro selekci rezistence pocházelo ze třech klonálních skupin (PG4, PG6, PG10) a dva kmeny patřily do citlivé skupiny nepříbuzných izolátů. Ze skupiny PG10 byly vybrány i kmeny původně rezistentní k teikoplaninu, poněvadž jsme chtěli zjistit, zdali je zvýšené riziko vzniku vankomycinové rezistence u geneticky příbuzných TEC rezistentních izolátů.

PAP u těchto kmenů odhalil, že distribuce minimálních inhibičních koncentrací teikoplaninu se pohybuje v širokém rozmezí 7 koncentrací (0,5 - 32 mg/l) a i u teikoplanin citlivých kmenů dochází již po jedнокrokové selekci k významnému snížení citlivosti a tvorbě rezistentních mutant. Zatímco distribuce MIC vankomycinu měla užší rozpětí (0,5 – 8 mg/l), s důležitou poznámkou, že medián MIC k vankomycinu u žádného kmene nepřesáhl hodnotu 4 mg/l. Tyto výsledky potvrdily závěry dřívějších studií, kde bylo shodně pozorováno, že MIC k teikoplaninu je distribuována do širší škály koncentrací, často přesahující hraniční koncentraci pro posuzování rezistence, zatímco MIC k vankomycinu je méně proměnlivá a většinou nepřesahuje hranici pro stanovení citlivosti (Goldstein et al. 1990; Vedel et al. 1990; Del' Alamo et al. 1999).

Obtížná selektovatelnost rezistence k vankomycinu *in vitro* u *S. epidermidis* jedнокrokovou selekcí byla pozorována například ve studiích Schwalbe *et al.*, nebo Domaracki *et al.*, kdy MIC k vankomycinu nepřekročily 4 mg/l (Schwalbe et al. 1987; Domaracki et al. 1998). V této práci byly jedнокrokovou selekcí na vankomycinu a teikoplaninu získány mutanty *S. epidermidis* rezistentní k vankomycinu s výrazně nižší frekvencí (2 – 6 %), než mutanty rezistentní k teikoplaninu (27 – 38 %). Nepotvrdilo se zvýšené riziko vzniku vankomycinové rezistence u geneticky příbuzných teikoplanin rezistentních izolátů, neboť z TEC rezistentních kmenů skupiny PG10 nebyla selektována

žádná VAN rezistentní mutanta. Ale zdá se, že rezistence ke glykopeptidovým antibiotikům je geneticky podmíněná, poněvadž u jednotlivých klonálních skupin se frekvence selekce rezistentních mutant výrazně lišila.

Dále jsme měli k dispozici sbírku klinických i komunitních izolátů *Staphylococcus haemolyticus* reprezentující izoláty z celého světa u kterých bylo zjištěno, že tvoří jednu klonální skupinu, která byla na základě genomových sekvencí rozdělena do kladů A – G (Cavanagh et al. 2014). Třináct kmenů z kladů A, B, E příbuzných klinických izolátů a tři kmeny nepříbuzných komunitních izolátů, z nichž každý představuje jeden samostatný klonální typ, byly vybrány pro výzkum rezistence ke glykopeptidům.

Jednoduchou jedнокrokovou selekcí u *S. haemolyticus* byly získány vankomycin rezistentní mutanty s podobně nízkou frekvencí jako u *S. epidermidis* (5 %) přičemž všechny VAN rezistentní mutanty byly odvozeny pouze z kmenů kladu E. K selekci teikoplanin rezistentních mutant docházelo s průměrnou frekvencí 40 %, i když frekvence se u jednotlivých skupin *S. haemolyticus* výrazně kolísala mezi 0 – 97 %. Kvůli nízké frekvenci selekce vankomycin rezistentních mutant jednoduchou jedнокrokovou selekcí, byly kmeny *S. haemolyticus* před vyšetím na selekční plotny preinkubovány v médiu se zvyšující se koncentrací VAN, čímž bylo dosaženo nárůstu selekčního tlaku pro vznik rezistence. Touto metodou vznikaly VAN rezistentní mutanty s dvakrát vyšší frekvencí (10 %), TEC rezistentní mutanty s průměrnou frekvencí 69% a rezistentní mutanty byly selektovány ve všech skupinách *S. haemolyticus*. Při preinkubaci kmenů s vankomycinem, koncentrace 4 mg/l seletovala nejvíce vankomycin i teikoplanin rezistentních mutant. Může to být tím, že tato koncentrace u většiny kmenů ještě nepůsobí inhibičně, ale zároveň vyvíjí dostatečný selekční tlak pro vznik mutací.

PAP kmenů *S. haemolyticus* po jedнокrokové selekci s vyšším selekčním tlakem ukázal, že křivky populační analýzy mají u kmenů s genetickou příbuzností (patřících do stejných kladů) podobný trend, i když jednotlivé kmeny v rámci kladu dosahují různé úrovně citlivosti. Podobný charakter růstu u příbuzných kmenů by mohl znamenat, že k vývoji rezistence dochází akumulací obdobných mutací a v rámci kladů by mohla existovat genetická predispozice k vývoji rezistence. To ovšem může být potvrzeno až analýzou SNP. Hraniční koncentrace vankomycinu, ve které byly všechny kmeny schopny růst v tekutém médiu, je 4 mg/l, což je i hraniční hodnota pro posuzování rezistence v klinické praxi.

V tekutém médiu s přídavkem VAN v koncentraci 8 mg/l rostlo již jen 6 kmenů z celkových 16 a všech šest patřilo mezi klinické izoláty (klady A, B, E). Klinický kmen 53-60, patřící do kladu B dokonce vykazoval mírný růst v tekutém médiu s přídavkem vankomycinu 16 mg/l. Tyto výsledky naznačují, že klinické izoláty *S. haemolyticus* mají lepší genetické předpoklady vyvíjet rezistenci, v porovnání s komunitními izoláty. Mohlo by to souviset s klonalitou klinických izolátů *S. haemolyticus*, které patří do jedné klonální skupiny. Ta pravděpodobně vznikla rozšířením klinicky úspěšného klonu se schopností vyvíjet rezistenci ke glykopeptidům. A naopak komunitní izoláty jsou samostatné klony bez genetické příbuznosti, z nichž každý může vyvíjet rezistenci různým způsobem. Naše zjištění koreluje s výsledky studie Schwalbe *et al.*, která porovnávala vznik vankomycinové rezistence u různých kmenů klinických i komunitních izolátů *S. haemolyticus*, kdy bylo zjištěno, že k vývoji rezistence dochází pouze u klinických izolátů (Schwalbe *et al.* 1990).

Pro účely porovnání frekvence vzniku rezistence *S. epidermidis* a *S. haemolyticus*, lze porovnan výsledky PAP analýzy po jednoduché jedнокrokové selekci u *S. epidermidis* na obrázku 14A a srovnat jej s PAP grafem obrázku 18A zobrazující profil populační analýzy kmenů *S. haemolyticus* po kultivaci v tekutém médiu bez přídavku VAN (což odpovídá jednoduché jedнокrokové selekci). Většina klinických izolátů *S. haemolyticus* rostla na agaru s koncentrací VAN 4 mg/l, zatímco na stejné koncentraci rostl jen jeden kmen *S. epidermidis*. 8 klinických izolátů *S. haemolyticus* dokázalo odolat koncentraci 8 mg/l, oproti tomu žádný z kmenů *S. epidermidis*. Zdá se, že *S. haemolyticus* je schopen výrazně rychleji selektovat rezistenci, než *S. epidermidis*, a to již po jednoduché jedнокrokové selekci. Podobné jsou i závěry studie Schwalbe *et al.*, kdy po jedнокrokové selekci docházelo k tvorbě klonů *S. haemolyticus* se sníženou citlivostí k vankomycinu a teikoplaninu, zatímco u kmenů *S. epidermidis* a *S. hominis* nedošlo k selekci mutant rezistentních ke glykopeptidům (Schwalbe *et al.* 1987). Tato vlastnost *S. haemolyticus* je zřejmě daná velkou plasticitou jeho genomu (Takeuchi *et al.* 2005), tím pádem schopností tohoto druhu velmi rychle se adaptovat na měnící se podmínky prostředí, což potvrzuje i fakt, že je to nejčastěji multirezistentní druh CoNS (Cavanagh *et al.* 2014). I přesto, že *S. haemolyticus* vyvíjí rezistenci rychleji, nepodmiňuje to vyšší úspěšnost v šíření mezi hostiteli, poněvadž stále je častěji izolovaným druhem *S. epidermidis* (Uckay *et al.* 2009).

Při testování PAP, jak u kmenů *S. epidermidis*, tak *S. haemolyticus* byl pozorován zajímavý jev, kdy i na miskách s inhibiční koncentrací antibiotika, která byla zjištěna testováním MIC mikrodiluční metodou, vyrostle malé množství CFU. Důvodem může být přítomnost heterorezistentních subpopulací buněk. Heterogenní rezistence k vankomycinu byla u kmenů *S. haemolyticus* i jiných koaguláza-negativních stafylokoků popsána již dříve (Nunes et al. 2006). Heterorezistenci se nám nepodařilo přímo potvrdit, poněvadž jsme neměli k dispozici kontrolní kmeny hVISA (Mu3) a VISA (Mu50), které by sloužily k porovnání výsledků PAP analýzy. Dalším jevem, který byl pozorován jak u kmenů *S. epidermidis*, tak *S. haemolyticus* a koreluje s hypotézou o heterorezistenci je růst kolonií na miskách s vyšší koncentrací glykopeptidů, než je jejich naměřená MIC. Tento fenomén byl pozorován u více než 80% testovaných kolonií *S. haemolyticus* se sníženou citlivostí ke glykopeptidům a vyskytoval se vysokou četností i u *S. epidermidis* (přesný údaj není k dispozici). Je tedy více než pravděpodobné, že se o heterorezistenci u kmenů *S. epidermidis* a *S. haemolyticus* jedná.

Víceřávková selekce se od jednorávkové liší v tom, že se kmeny již od začátku kultivují v tekutém médiu s přidávkou antibiotika a pro další krok selekce se vybírá kolonie s nejvyšší dosaženou MIC, nebo celá populace buněk. Víceřávkovou selekci VAN a TEC rezistentních mutantů na vankomycinu prováděl Mgr. Vladimír Vimberg, PhD. Rozdíl v účinnosti jednorávkové a víceřávkové selekce je patrný z maximálních hodnot MIC k vankomycinu a teikoplaninu, které byly u *S. epidermidis* a *S. haemolyticus* danou selekcí dosaženy. Jednoduchou jednorávkovou selekcí se podařilo získat mutanty s maximálními hodnotami MIC k vankomycinu 8 mg/l a 16 mg/l a maximálními hodnotami MIC k teikoplaninu 32 a 64 mg/l pro *S. epidermidis* a *S. haemolyticus* respektive. Obě metody se výsledkem nelišily v případě selekce rezistentních mutantů u *S. epidermidis*, tudíž se dá říct, že víceřávková selekce u *S. epidermidis* nebyla úspěšnější, než jednorávková. Oproti tomu víceřávková selekce u *S. haemolyticus* vedla ke vzniku rezistentních mutantů s čtyřikrát vyššími MIC (MIC (VAN) = 64 mg/l; MIC (TEC) = 256 mg/l), než po jednorávkové selekci. Vyšší selekční tlak tedy podpořil vznik rezistence u *S. haemolyticus*, oproti tomu už nezpůsobil selekci vyšší rezistence u *S. epidermidis*. Obecně kmeny *S. epidermidis* dosahovaly jak po jednorávkové, tak víceřávkové selekci nižší úroveň rezistence, než kmeny *S. haemolyticus* a vždy MIC k teikoplaninu vykazovala vyšší hodnoty než MIC k vankomycinu. Tyto výsledky korelují se

závěry studií Biavasco *et al* a Schwalbe *et al.*, v nichž po selekci rezistence ke glykopeptidům měly kmeny *S. epidermidis* vždy nižší hodnoty MIC, než kmeny *S. haemolyticus* a zároveň MIC k VAN nebyla nikdy vyšší, než MIC k TEC (Schwalbe *et al.* 1990; Biavasco *et al.* 1991).

U *Staphylococcus aureus* bylo prokázáno, že kromě vankomycinu i β -laktamové antibiotikum imipenem může indukovat vznik hVISA. Katayama *et al.* vyselekovali 5 kolonií vykazujících hVISA rezistenční fenotyp z 50 klonů původně vankomycin citlivého kmene, který byl inkubován se selekční koncentrací imipenemu (8 mg/l). S využitím vícekrokové selekce v přítomnosti zvyšující se koncentrace imipenemu jsme chtěli ověřit, zdali k vývoji zkřížené rezistence ke glykopeptidům dochází i u koaguláza-negativních stafylokoků. Byly testovány 2 kmeny *S. epidermidis*, 2 kmeny *S. haemolyticus* a jeden kmen *S. pasteurii*, a pouze u kmenů *S. haemolyticus* došlo ke snížení citlivosti ke glykopeptidům. U jednoho kmene se MIC k vankomycinu zvýšila čtyřikrát, aniž by však překročila hladinu rezistence a u druhého kmene *S. haemolyticus* byly selektovány teikoplanin rezistentní mutanty. Je však zajímavé, že přestože tyto kmeny byly již původně rezistentní k imipenemu (MIC = 128 mg/l) jejich MIC se v průběhu selekce ještě dvakrát zvýšila. Nabízelo by se vysvětlení, že zkřížená rezistence ke glykopeptidům vzniká v přítomnosti imipenemu pouze u původně imipenem rezistentních kmenů v důsledku působení vyššího selekčního tlaku. Nicméně u kmene GPR38 *S. epidermidis*, který byl také původně rezistentní k imipenemu (MIC = 32 mg/l) a MIC k imipenemu se u něj v průběhu selekce ještě čtyřikrát zvýšila, nedošlo k žádným změnám v citlivosti ke glykopeptidům. Zdá se tedy, že narozdíl od kmenů *S. epidermidis* a *S. pasteurii* u kmenů *S. haemolyticus* selekční tlak imipenemu vyvolal genetické změny vedoucí ke snížení citlivosti ke glykopeptidům. Přítomnost případných mutací v genomu obou kmenů *S. haemolyticus*, u kterých došlo ke změně citlivosti v důsledku působení imipenemu, bude zjištěna po dokončení analýz jedno nukleotidových polymorfismů.

Také v případě vzniku rezistence k rifampicinu byl pozorován vliv na citlivost ke glykopeptidům. Selekcí hVISA kmene na rifampicinu došlo ke spontánnímu vzniku mutace v genu *rpoB* kódující β podjednotku RNA polymerázy a zároveň i ke konverzi hVISA na VISA (Matsuo *et al.* 2011). Schopnost rifampicinu selektovat zkříženou rezistenci ke glykopeptidům jsme ověřovali u stejných 5 kmenů CoNS jako při selekci na imipenemu. Vícekroková selekce ve zvyšujících se koncentracích rifampicinu založená na celé populaci vedla u všech testovaných kmenů ke snížení citlivosti k rifampicinu minimálně 4000 krát, což

u všech kmenů vedlo ke vzniku rezistence k RIF a zároveň k teikoplaninu, pouze kmen GPR38 *S. epidermidis* byl již původně rezistentní k TEC. U testovaných kmenů byl pozorován minimálně dvojnásobný nárůst MIC k teikoplaninu. Citlivost k vankomycinu se snížila u třech kmenů. U obou kmenů *S. haemolyticus* selekce zapříčinila nárůst MIC k VAN na 4 mg/l a u kmene 43 *S. epidermidis* dokonce na 8 mg/l. Takže pouze u kmene 43 zvýšení MIC dosáhlo hraniční koncentrace pro posuzování citlivosti k vankomycinu. Rifampicin tedy u původně glykopeptid citlivých koaguláza-negativních stafylokoků vyvolává vznik zkřížené rezistence k teikoplaninu a může přispět ke změně citlivosti k vankomycinu.

Při léčbě infekcí vyvolaných MRSA kmeny byl popsán zajímavý tzv. seesaw effect, kdy při snižování citlivosti ke glykopeptidům či lipoglykopeptidům dochází ke zvýšení/obnovení citlivosti k β -laktamovým antibiotikům (Ortwine et al. 2013). Tohoto efektu je využíváno i v klinické praxi, kde bylo prokázáno, že kombinovaná terapie vankomycinu s β -laktamy podporuje synergické působení těchto antibiotik a vede k účinnější eradikaci mikroorganismů, než monoterapie vankomycinem (Dilworth et al. 2014). Chtěli jsme zjistit, zdali nově vzniklá rezistence ke glykopeptidům povede ke změně citlivosti k imipenemu, popřípadě ke vzniku „seesaw efektu“. Při selekci rezistence nebo velké změně citlivosti k vankomycinu dochází ke změně citlivosti k imipenemu u většiny kmenů *S. haemolyticus*, pocházejících z klinického prostředí. U 8 z 9 testovaných klinických izolátů *S. haemolyticus* vedla selekce rezistence k vankomycinu (nebo výrazný pokles citlivosti; MIC \geq 4 mg/l) ke vzniku rezistence k imipenemu (MIC > 8 mg/l). Nedochozí však ke vzniku rezistence k imipenemu u všech třech komunitních izolátů a jednoho klinického izolátu *S. haemolyticus* se sníženou citlivostí k vankomycinu (MIC \geq 4; < 8 mg/l). U tohoto klinického izolátu (51-58) se dokonce MIC k IPM dvakrát snížila, což by mohl být důsledek „seesaw efektu“. Je možné, že pouze menší změna citlivosti ke glykopeptidům vyvolává tento efekt. Avšak u komunitních izolátů „seesaw efekt“ pozorován nebyl. Je zajímavé, že pouze u klinických izolátů *S. haemolyticus*, u kterých se citlivost k vankomycinu snížila 6 krát a více dochází k selekci zkřížené rezistence k imipenemu, u komunitních kmenů však toto pravidlo neplatí. Klinické izoláty možná disponují určitými genetickými předpoklady ke vzniku rezistence, které jim napomohly k adaptaci v nemocničním prostředí, jež chybí u komunitních kmenů.

Fenotypovou analýzu mutantních kmenů *S. haemolyticus*, *S. epidermidis* a *S. pasteuri* se sníženou citlivostí ke glykopeptidům, vybraných pro sekvenaci, se podařilo provést pouze

částečně. Byla otestována produkce biofilmu, ale protokol pro testování autolýzy se bohužel nepodařilo optimalizovat, takže mutantní kmeny nebyly na autolýzu testovány.

Patogenita *S. epidermidis* bývá často spojována se schopností tvořit biofilm (Otto 2014). Při našem testování (uvádím sloučené výsledky mého testování a testování Mgr. Leony Zieglerové) 41,7 % (5 ze 12) rodičovských kmenů *S. epidermidis* vykazovalo tvorbu biofilmu. To je ve shodě s výsledky mnohem rozsáhlejší studie charakterizující 293 klinických izolátů CoNS, kdy 40 % ze všech kmenů *S. epidermidis* produkovalo biofilm (de Allori et al. 2006). Z 5 rodičovských kmenů *S. epidermidis*, 3 kmeny z klonální skupiny PG10 tvořily pouze slabý biofilm, stejně jako kmen 43 z PG4 skupiny, zatímco kmen 51 citlivé nepříbuzné skupiny byl schopen produkce velmi silného biofilmu. Od každého rodičovského kmene byly testovány 3 mutantní kmeny se sníženou citlivostí ke glykopeptidům. Vznik rezistence ke glykopeptidům napomohl při tvorbě biofilmu u 8 % mutant selektovaných z rodičovských kmenů. Pokud byla při testování přidávána subinhibiční koncentrace vankomycinu, dále to neovlivnilo produkci biofilmu, zatímco subinhibiční koncentrace teikoplaninu podpořila novou tvorbu biofilmu u 11 % mutantních kmenů, které bez přídatku antibiotika nebyly schopny biofilm tvořit. Rodičovský kmen 65 *S. pasteurii* ani z něj odvozené mutanty se sníženou citlivostí ke glykopeptidům neměly schopnost tvořit biofilm.

Pouze u jednoho ze 16 testovaných rodičovských kmenů *S. haemolyticus* (51-33) (6 %) byla prokázána tvorba silného biofilmu. Ve srovnání se 42 % identifikovaných producentů biofilmu ze všech kmenů *S. haemolyticus* izolovaných v klinické studii de Allori et al., je to nepoměrně málo (de Allori et al. 2006). Od každého rodičovského kmene byly testovány 4 mutantní kmeny se sníženou citlivostí ke glykopeptidům. U 3 % mutantních kmenů koreloval vznik glykopeptidové rezistence se zvýšenou tvorbou slabého biofilmu. Subinhibiční koncentrace jak vankomycinu, tak teikoplaninu u žádného kmene nepodpořila tvorbu biofilmu, přičemž u mutantních kmenů odvozených od 51-33 schopnost tvorby biofilmu spíše potlačila. Vzhledem k tomu, že u glykopeptid rezistentních mutant ani rodičovských kmenů *S. haemolyticus* nebyla zjištěna schopnost produkce biofilmu, je možné, že tento druh využívá spíše jiných mechanismů k docílení patogenity a šíření mezi hostiteli, než je tvorba biofilmu, například své výborné schopnosti akumulovat genetické determinanty rezistence.

Možné vysvětlení negativních výsledků testování autolýzy je dosažení jiné hladiny optické density před navozením autolýzy přidáním Tritonu X-100, než je uvedeno v manuálu. Je však patrné, že i u kmenů, u nichž byla autolýza zahájena ve správném rozmezí optické density, dosahuje pouze nízkých hladin. Dalším vysvětlením by mohl být nedostatečný čas pro autolýzu vyvolanou přidáním Tritonu X-100, která probíhala 2 hodiny, zatímco v jiných experimentech bývá u CoNS nastavena i na více než dvakrát delší čas (Nunes et al. 2006).

V poslední řadě jsem se pokoušela otestovat systém na ověření mutací podmiňujících glykopeptidovou rezistenci u koaguláza-negativních stafylokoků. Základem je sbírka transpozonových mutant (NTML), kde jsou k dispozici inzerční mutanty všech neesenciálních genů *S. aureus* USA300 (UNMC 2016). Lze tedy místo těchto genů vkládat mutované a nemutované varianty genů CoNS. Mutace v proteinu VraS (Q289K) je zodpovědná za 16 – 32 násobného snížení citlivosti k teikoplaninu u *S. haemolyticus* (Vimberg et al. 2018a). Tuto vlastnost jsem chtěla ověřit vložením této varianty mutovaného genu *vraS* (*vraS_{ShQ289K}*) z kmene *S. haemolyticus* do kmene NE823 z knihovny NTML (místo transpozonové inserce, kterou nese v genu *vraS*) a následným testováním citlivosti k TEC. Výsledky testování citlivosti kmene NE823 s mutantní variantou *vraS* (*vraS_{ShQ289K}*), v porovnání s kmenem s nemutovanou variantou *vraS* (*vraS_{Sh}*) a kmenem s prázdným plazminem, však nepotvrdily funkčnost systému. Jak při testování mikrodiluční metodou, tak E-testy, došlo pouze k dvojnásobnému snížení citlivosti k teikoplaninu. Bylo zjištěno, že *S. aureus* reaguje na různé druhy antibiotik, působících na buněčnou stěnu (např. β -laktamy, glykopeptidy) prostřednictvím dvou komponentového systému VraSR, který reguluje geny stimulonu buněčné stěny, což pravděpodobně způsobuje rezistenci k těmto antibiotikům. Geny *vraS* a *vraR* jsou součástí operonu *orf1-yvqF-vraS-vraR* a tento regulační systém ovlivňuje celou kaskádu dalších genů (McCallum et al. 2011). Proteiny VraS jsou u *S. aureus* a *S. haemolyticus* identické z 92 % a nelze je zřejmě jednoduše zaměnit. VraS interaguje se svými funkčními partnery (VraR, YvqF), a pokud není tento protein u obou organismů úplně totožný, mohou být tato interakce i přenos signálu narušeny. Proto se nepodařilo zkonstruovat systém založený na *S. aureus* na ověření mutací CoNS.

Kmeny *S. epidermidis*, u nichž byla selektována rezistence ke glykopeptidům, byly podrobeny celogenomovému sekvenování a analýze jedno nukleotidových polymorfismů. Jedno aminokyselinové záměny se nacházely převážně v proteinech účastnících se regulace

syntézy či metabolismu buněčné stěny a tyto změny korelují s modifikacemi nalezenými u glykopeptid-rezistentních *S. aureus* (Hu et al. 2016). Zdá se, že genetický mechanismus glykopeptidové rezistence bude tedy podobný jako u *S. aureus*. Byly identifikovány i nové mutace v proteinech PitA a PitT účastníci se transportu anorganického fosfátu. Tyto proteiny jsou kódovány v GraS operonu, který se u *S. aureus* taktéž podílí na vzniku glykopeptidové rezistence (Cui et al. 2009), avšak asociace mutací v těchto dvou konkrétních proteinech s glykopeptidovou rezistencí je popsána nově. Potvrdila se naše hypotéza, že u geneticky příbuzných kmenů dochází ke vzniku rezistence podobnými drahami. U skupiny geneticky příbuzných kmenů, které byly původně identifikovány na základě PFGE profilu (PG10) docházelo ke vzniku rezistence zejména mutacemi v proteinu TagA, který se účastní biosyntézy teichoových kyselin, jež jsou esenciální součástí buněčné stěny stafylokoků.

V souvislosti s tvorbou systému na ověření mutací jsem se snažila za pomoci internetové databáze na vyhledávání homologních sekvencí (BLAST) a Nebraska Transposon Mutant Library Screening Array ověřit, zdali se v knihovně NTML nenalézají kmeny s insercemi transpozonů v genech, v nichž byly identifikované mutace (související s glykopeptidovou rezistencí) u *S. epidermidis* a *S. pasteurii*. Chtěla jsem vytipovat vhodné kandidátní geny *S. epidermidis* pro vkládání do *S. aureus* USA300. Ověřovala jsem, zdali v NTML existuje inzerční mutanta pro daný gen, i jaká je procentuální podobnost (query cover) a identita genů. Zaměřila jsem se na polohu genu v genomu kvůli odhalení případných interakcí a na podobnost interagujících partnerů. Zjišťovala jsem i funkci proteinů kódovaných danými geny, a dále jsem analyzovala, jak jsou dané rezistentní mutace v proteinu konzervované, a tudíž jak delece mohou ovlivnit funkci proteinu. Identifikovala jsem 11 kandidátních genů a pro 10 z nich byla přítomna v NTML inzerční mutanta. Z těchto 10 byly vybrány pouze geny s procentuální podobností vyšší než 90% u *S. aureus* i *S. epidermidis/S. pasteurii*, u nichž nebyly nalezeny žádné interakce a zároveň u *S. epidermidis/S. pasteurii* zvyšovaly citlivost k vankomycinu či teikoplaninu minimálně 4 krát. Takové byly dva, gen kódující ISSep1-like transpozázu, u nějž byly identifikovány 2 rozdílné mutace v kmenech 43 a 46 *S. epidermidis*, které podmiňují 4 - 5 násobné zvýšení MIC k vankomycinu a teikoplaninu. Tato transpozáza patří do IS116/IS110/IS902 rodiny a zprostředkovává transpozici inzerčních sekvencí či transpozonové DNA. Druhý gen kóduje konzervovaný hypotetický membránový protein s neznámou funkcí, jehož mutace (H166R)

byla nalezena v kmeni 65 *S. pasteurii*. Fenotypový projev těchto mutací by tedy bylo možné zkoumat v *S. aureus*.

Mutace (H166R) v hypotetickém proteinu klinického izolátu 65 zvyšuje MIC k teikoplaninu 8 krát a MIC k vankomycinu 2,7 krát. Fakt, že pouze tato jediná mutace u *S. pasteurii* způsobuje významné snížení citlivosti ke glykopeptidům byl zdokumentován v článku **Decreased glycopeptide susceptibility in *Staphylococcus pasteurii* associated with a mutation in uncharacterised conserved membrane protein STP1_1701** (publikován jako dopis vydavateli), u nějž jsem uvedena jako spoluautor (Vimberg et al. 2018b).

Plný význam této práce bude znám, až budou anotovány všechny sekvenované genomy vybraných rezistentních mutantů, a výsledky fenotypového testování budou dány do kontextu s případnými nalezenými mutacemi.

7 Souhrn

- Jednokrokovou selekcí byly získávány vankomycin rezistentní mutanty *S. epidermidis* i *S. haemolyticus* s výrazně nižší frekvencí, než teikoplanin rezistentní mutanty. Při zvýšení selekčního tlaku preinkubací kmenů *S. epidermidis* ve zvyšující se koncentraci vankomycinu, vznikaly vankomycin rezistentní mutanty s dvakrát vyšší frekvencí. Koncentrace 4 mg/l (která je považována za hraniční pro posuzování citlivosti ke glykopeptidům u CoNS) použitá pro preinkubaci, seletovala nejvíce vankomycin i teikoplanin rezistentních mutant.
- Kmeny *S. epidermidis* dosahovaly nižší úrovně rezistence, v porovnání s kmeny *S. haemolyticus*, jak po jednokrokové, tak vícekrokové selekci. Oba kmeny vykazovaly heterorezistenci ke glykopeptidům, která byla detekována růstem kolonií na miskách s vyšší koncentrací antibiotika, než je jejich výsledná MIC.
- Seleční tlak imipenemu při vícekrokové selekci u 5 klinických izolátů CoNS vyvolal snížení citlivosti ke glykopeptidům pouze u dvou, původně imipenem rezistentních, kmenů *S. haemolyticus*. Naopak při snížení citlivosti k vankomycinu (více než šestinásobném) docházelo u klinických izolátů *S. haemolyticus* k selekci zkřížené rezistence k imipenemu. U komunitních izolátů k témuž nedocházelo. V klinické praxi často popisovaný „seesaw efekt“, kdy se v důsledku snížení citlivosti k vankomycinu zvýšila citlivost k imipenemu, byl pozorován pouze u jednoho klinického izolátu *S. haemolyticus*.
- Vícekroková selekce na rifampicinu, způsobující vznik rezistence k RIF u všech izolátů, vyvolala taktéž u všech 5 testovaných klinických kmenů CoNS rezistenci k teikoplaninu a u 3 přispěla ke snížení citlivosti k vankomycinu.
- Produkce biofilmu byla detekována u 42 % rodičovských kmenů *S. epidermidis* a pouze 6 % *S. haemolyticus*. Vznik rezistence ke glykopeptidům napomohl při tvorbě biofilmu u 8 % a 3 % mutantních kmenů *S. epidermidis* a *S. haemolyticus*, respektive. Testování autolýzy nebylo provedeno, poněvadž se nepodařilo optimalizovat protokol.

- Navržený systém na ověření mutací udílejících rezistenci ke glykopeptidům u CoNS, založený na *S. aureus*, nebyl funkční. Zřejmě z důvodu nekompatibility proteinu VraS (Q289K) pocházejícího ze *S. haemolyticus*, kódovaného mutovaným genem *vraS_{ShQ289K}*, se svými funkčními partnery (VraR, YvqF) v hostitelském organismu *S. aureus* NE823.
- Potvrdila se naše hypotéza, že u geneticky příbuzných kmenů dochází ke vzniku rezistence podobnými drahami, jak na základě testování PAP, tak z výsledků analýzy SNP. Nalezené mutace se nacházely převážně v genech regulujících syntézu a metabolismus buněčné stěny (podobně jako u *S. aureus*).
- V NTML byly vytipovány 2 kandidátní geny (v nichž byly identifikovány mutace spojené s glykopeptidovou rezistencí u *S. epidermidis*), které by bylo možné vkládat do *S. aureus* USA300 a posléze zkoumat jejich fenotypový projev.

8 Seznam použité literatury

- Águila-Arcos S, Álvarez-Rodríguez I, Garaiyurrebaso O, Garbisu C, Grohmann E, Alkorta I. Biofilm-forming clinical *Staphylococcus* isolates harbor horizontal transfer and antibiotic resistance genes. *Front Microbiol.* 2017;8(OCT).
- Al Laham N, Rohde H, Sander G, Fischer A, Hussain M, Heilmann C, et al. Augmented expression of polysaccharide intercellular adhesin in a defined *Staphylococcus epidermidis* mutant with the small-colony-variant phenotype. *J Bacteriol.* 2007;189(12):4494–501.
- Arthur M, Depardieu F, Molinas C, Reynolds P, Courvalin P. The *vanZ* gene of Tn1546 from enterococcus faecium BM4147 confers resistance to teicoplanin. *Gene.* 1995;154(1):87–92.
- Arthur M, Molinas C, Depardieu F, Courvalin P. Characterization of Tn1546, a Tn3-related transposon conferring glycopeptide resistance by synthesis of depsipeptide peptidoglycan precursors in *Enterococcus faecium* BM4147. *J Bacteriol.* 1993;
- Aslangul E, Massias L, Meulemans A, Chau F, Andremont A, Courvalin P, et al. Acquired gentamicin resistance by permeability impairment in *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50(11):3615–21.
- Ayliffe GAJ. The Progressive Intercontinental Spread of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis [Internet].* 1997;24(Supplement_1):S74–9. Dostupné z: http://academic.oup.com/cid/article/24/Supplement_1/S74/283551/The-Progressive-Intercontinental-Spread-of
- Bae T, Glass EM, Schneewind O, Missiakas D. Generating a collection of insertion mutations in the *Staphylococcus aureus* genome using *bursa aurealis*. *Methods Mol Biol.* 2008;
- Bailey J, Summers KM. Dalbavancin: A new lipoglycopeptide antibiotic. Roč. 65, *American Journal of Health-System Pharmacy.* 2008. s. 599–610.
- Barna JCJ, Williams DH, Stone DJM, Leung TWC, Doddrell DM. Structure Elucidation of the Teicoplanin Antibiotics. *J Am Chem Soc.* 1984;106(17):4895–902.
- Bartlett JG. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: Analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Infect Dis Clin Pract.* 2004;12(6):376.
- Beauregard DA, Williams DH, Gwynn MN, Knowles DJC. Dimerization and membrane anchors in extracellular targeting of vancomycin group antibiotics. Roč. 39, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 1995. s. 781–5.
- Becker K, Heilmann C, Peters G. Coagulase-negative staphylococci. *Clin Microbiol Rev.* 2014;27(4):870–926.
- Belley A, McKay GA, Arhin FF, Sarmiento I, Beaulieu S, Fadhil I, et al. Oritavancin disrupts membrane integrity of *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant enterococci to effect rapid bacterial killing. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(12):5369–71.
- Benquan W, Yingchun T, Kouxing Z, Tiantuo Z, Jiaying Z, Shuqing T. *Staphylococcus* heterogeneously resistant to vancomycin in China and antimicrobial activities of imipenem and vancomycin in combination against it. *J Clin Microbiol [Internet].* březen 2002 [citován 17. červenec 2018];40(3):1109–12. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11880455>
- Biavasco F, Giovanetti E, Montanari MP, Lupidi R, Varaldo PE. Development of in-vitro resistance to glycopeptide antibiotics: Assessment in staphylococci of different species. *J Antimicrob Chemother.* 1991;
- Bloemendaal ALA, Brouwer EC, Fluit AC. Methicillin resistance transfer from *Staphylococcus epidermidis* to methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* in a patient during antibiotic therapy. *PLoS One.* 2010;5(7).

- Boyle-Vavra S, Challapalli M, Daum RS. Resistance to autolysis in vancomycin-selected *Staphylococcus aureus* isolates precedes vancomycin-intermediate resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;
- Butler MS, Hansford KA, Blaskovich MAT, Halai R, Cooper MA. Glycopeptide antibiotics: Back to the future. Roč. 67, *Journal of Antibiotics.* 2014. s. 631–44.
- Cameron DR, Ward D V., Kostoulias X, Howden BP, Moellering RC, Eliopoulos GM, et al. Serine/threonine phosphatase *stp1* contributes to reduced susceptibility to vancomycin and virulence in *staphylococcus aureus*. *J Infect Dis.* 2012;205(11):1677–87.
- Cavanagh JP, Hjerde E, Holden MTG, Kahlke T, Klingenberg C, Flægstad T, et al. Whole-genome sequencing reveals clonal expansion of multiresistant *Staphylococcus haemolyticus* in European hospitals. *J Antimicrob Chemother.* 2014;69(11):2920–7.
- Cogen AL, Yamasaki K, Sanchez KM, Dorschner RA, Lai Y, MacLeod DT, et al. Selective antimicrobial action is provided by phenol-soluble modulins derived from *staphylococcus epidermidis*, a normal resident of the skin. *J Invest Dermatol.* 2010;130(1):192–200.
- Corrigan RM, Foster TJ. An improved tetracycline-inducible expression vector for *Staphylococcus aureus*. *Plasmid.* 2009;
- Cuevas O, Cercenado E, Vindel A, Guinea J, Sánchez-Conde M, Sánchez-Somolinos M, et al. Evolution of the antimicrobial resistance of *Staphylococcus* spp. in Spain: Five nationwide prevalence studies, 1986 to 2002. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48(11):4240–5.
- Cui L, Ma X, Sato K, Okuma K, Tenover FC, Mamizuka EM, et al. Cell wall thickening is a common feature of vancomycin resistance in *_Staphylococcus aureus_*. *J Clin Microbiol.* 2003;41(0095–1137 (Print)):5–14.
- Cui L, Neoh HM, Shoji M, Hiramatsu K. Contribution of *vraSR* and *graSR* point mutations to vancomycin resistance in vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(3):1231–4.
- Daum RS, Gupta S, Sabbagh R, Milewski WM. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates with decreased susceptibility to vancomycin and teicoplanin: Isolation and purification of a constitutively produced protein associated with decreased susceptibility. *J Infect Dis.* 1992;
- De Allori MCG, Jure MA, Romero C, de Castillo MEC. Antimicrobial resistance and production of biofilms in clinical isolates of coagulase-negative *Staphylococcus* strains. *Biol Pharm Bull.* 2006;29(8):1592–6.
- Del' Alamo L, Cereda RF, Tosin I, Miranda EA, Sader HS. Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative staphylococci and characterization of isolates with reduced susceptibility to glycopeptides. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 1999;
- Deurenberg RH, Stobberingh EE. The evolution of *Staphylococcus aureus*. *Infection, Genetics and Evolution.* 2008.
- Diep BA, Gill SR, Chang RF, Phan TH Van, Chen JH, Davidson MG, et al. Complete genome sequence of USA300, an epidemic clone of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet.* 2006;
- Dilworth TJ, Ibrahim O, Hall P, Sliwinski J, Walraven C, Mercier RC. β -Lactams enhance vancomycin activity against methicillin-Resistant *staphylococcus aureus* bacteremia compared to vancomycin alone. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;
- Domaracki BE, Evans A, Preston KE, Fraimow H, Venezia RA. Increased oxacillin activity associated with glycopeptides in coagulase-negative staphylococci. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1998;
- Ehlers MM, Strasheim W, Lowe M, Ueckermann V, Kock MM. Molecular Epidemiology of *Staphylococcus epidermidis* Implicated in Catheter-Related Bloodstream Infections at an Academic Hospital in Pretoria, South Africa. *Front Microbiol [Internet].* 7. březen 2018 [citován 31. březen 2018];9:417. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29563910>

- El-Halfawy OM, Valvano MA. Antimicrobial heteroresistance: An emerging field in need of clarity. Roč. 28, *Clinical Microbiology Reviews*. 2015. s. 191–207.
- Fairbrother RW. Coagulase production as a criterion for the classification of the staphylococci. *J Pathol Bacteriol* [Internet]. 1. leden 1940 [citován 22. únor 2018];50(1):83–8. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/path.1700500112>
- Faron ML, Ledebner NA, Buchan BW. Resistance mechanisms, epidemiology, and approaches to screening for vancomycin-resistant *Enterococcus* in the health care setting. Roč. 54, *Journal of Clinical Microbiology*. 2016. s. 2436–47.
- Fey PD, Endres JL, Yajjala VK, Widhelm TJ, Boissy RJ, Bose JL, et al. A genetic resource for rapid and comprehensive phenotype screening of nonessential *Staphylococcus aureus* genes. *MBio*. 2013;4(1):1–8.
- Finan JE, Archer GL, Pucci MJ, Climo MW. Role of Penicillin-Binding Protein 4 in Expression of Vancomycin Resistance among Clinical Isolates of Oxacillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001;45(11):3070–5.
- Fontana R, Grossato A, Rossi L, Cheng YR, Satta G. Transition from resistance to hypersusceptibility to β -lactam antibiotics associated with loss of a low-affinity penicillin-binding protein in a *Streptococcus faecium* mutant highly resistant to penicillin. *Antimicrob Agents Chemother*. 1985;28(5):678–83.
- Froggatt JW, Johnston JL, Galetto DW, Archer GL. Antimicrobial resistance in nosocomial isolates of *Staphylococcus haemolyticus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1989;33(4):460–6.
- Gardete S, Kim C, Hartmann BM, Mwangi M, Roux CM, Dunman PM, et al. Genetic pathway in acquisition and loss of vancomycin resistance in a methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strain of clonal type USA300. *PLoS Pathog*. 2012;8(2).
- Ge M, Chen Z, Onishi HR, Kohler J, Silver LL, Kerns R, et al. Vancomycin derivatives that inhibit peptidoglycan biosynthesis without binding D-Ala-D-Ala. *Science* (80-). 1999;284(5413):507–11.
- Goldman RC, Baizman ER, Longley CB, Branstrom AA. Chlorobiphenyl-desleucyl-vancomycin inhibits the transglycosylation process required for peptidoglycan synthesis in bacteria in the absence of dipeptide binding. *FEMS Microbiol Lett*. 2000;183(2):209–14.
- Goldstein FW, Coutrot A, Sieffer A, Acar JF. Percentages and distributions of teicoplanin- and vancomycin-resistant strains among coagulase-negative staphylococci. *Antimicrob Agents Chemother*. 1990;
- Hafer C, Lin Y, Kornblum J, Lowy FD, Uhlemann AC. Contribution of selected gene mutations to resistance in clinical isolates of vancomycin-intermediate staphylococcus aureus. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56(11):5845–51.
- Hanaki H. Activated cell-wall synthesis is associated with vancomycin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strains Mu3 and Mu50. *J Antimicrob Chemother* [Internet]. 1998;42(2):199–209. Dostupné z: <https://academic.oup.com/jac/article-lookup/doi/10.1093/jac/42.2.199>
- Hawser SP, Bouchillon SK, Hoban DJ, Dowzicky M, Babinchak T. Rising incidence of *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin and susceptibility to antibiotics: A global analysis 2004-2009. *Int J Antimicrob Agents*. 2011;37(3):219–24.
- Heikens E, Fleer A, Paauw A, Florijn A, Fluit AC. Comparison of genotypic and phenotypic methods for species-level identification of clinical isolates of coagulase-negative staphylococci. *J Clin Microbiol*. 2005;43(5):2286–90.
- Higgins DL, Chang R, Debabov D V., Leung J, Wu T, Krause KM, et al. Telavancin, a multifunctional lipoglycopeptide, disrupts both cell wall synthesis and cell membrane integrity in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49(3):1127–34.

- Hiramatsu K. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*: A new model of antibiotic resistance. Roč. 1, *Lancet Infectious Diseases*. 2001. s. 147–55.
- Hiramatsu K, Aritaka N, Hanaki H, Kawasaki S, Hosoda Y, Hori S, et al. Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. *Lancet*. 1997a;350(9092):1670–3.
- Hiramatsu K, Cui L, Kuroda M, Ito T. The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Roč. 9, *Trends in Microbiology*. 2001. s. 486–93.
- Hiramatsu K, Hanaki H, Ino T, Yabuta K, Oguri T, Tenover FC. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility [1]. Roč. 40, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 1997b. s. 135–6.
- Hirschhausen N, Schlesier T, Schmidt MA, Götz F, Peters G, Heilmann C. A novel staphylococcal internalization mechanism involves the major autolysin Atl and heat shock cognate protein Hsc70 as host cell receptor. *Cell Microbiol*. 2010;12(12):1746–64.
- Holden MTG, Hsu L-Y, Kurt K, Weinert LA, Mather AE, Harris SR, et al. A genomic portrait of the emergence, evolution, and global spread of a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* pandemic. *Genome Res*. 2013;
- Hu Q, Peng H, Rao X. Molecular events for promotion of vancomycin resistance in vancomycin intermediate *Staphylococcus aureus*. Roč. 7, *Frontiers in Microbiology*. 2016.
- Hunt AH, Molloy RM, Occolowitz JL, Marconi GG, Debono M. Structure of the major glycopeptide of the teicoplanin complex. *J Am Chem Soc [Internet]*. srpen 1984 [citován 31. březem 2018];106(17):4891–5. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ja00329a043>
- Chen CJ, Lin MH, Shu JC, Lu JJ. Reduced susceptibility to vancomycin in isogenic *Staphylococcus aureus* strains of sequence type 59: Tracking evolution and identifying mutations by whole-genome sequencing. *J Antimicrob Chemother*. 2014;69(2):349–54.
- Chen L, Walker D, Sun B, Hu Y, Walker S, Kahne D. Vancomycin analogues active against vanA-resistant strains inhibit bacterial transglycosylase without binding substrate. *Proc Natl Acad Sci U S A [Internet]*. 2003;100(10):5658–63. Dostupné z: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=156257&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Cheng M, Ziora ZM, Hansford KA, Blaskovich MA, Butler MS, Cooper MA. Anti-cooperative ligand binding and dimerisation in the glycopeptide antibiotic dalbavancin. *Org Biomol Chem [Internet]*. 2014;12(16):2568–75. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C3OB42428F>
- Cheung GYC, Rigby K, Wang R, Queck SY, Braughton KR, Whitney AR, et al. *Staphylococcus epidermidis* strategies to avoid killing by human neutrophils. *PLoS Pathog*. 2010;6(10).
- Chmara H, I P A SR, Mignini F, Borowski E. Bacteriolytic effect of teicoplanin. *J Gen Microbiol*. 1991;137(9).
- Ito T, Katayama Y, Hiramatsu K. Cloning and nucleotide sequence determination of the entire mec DNA of pre-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* N315. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999;
- Jamaluddin TZMT, Kuwahara-Arai K, Hisata K, Terasawa M, Cui L, Baba T, et al. Extreme genetic diversity of methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* strains disseminated among healthy Japanese children. *J Clin Microbiol*. 2008;46(11):3778–83.
- Jevons MP. “Celbenin” - resistant *Staphylococci*. *BMJ [Internet]*. 14. leden 1961 [citován 31. červenec 2018];1(5219):124–5. Dostupné z: <http://www.bmj.com/cgi/doi/10.1136/bmj.1.5219.124-a>
- Kaatz GW, Seo SM, Dorman NJ, Lerner SA. Emergence of teicoplanin resistance during therapy of *Staphylococcus aureus* endocarditis. *J Infect Dis*. 1990;162(1):103–8.

- Kahne D, Leimkuhler C, Lu W, Walsh C. Glycopeptide and lipoglycopeptide antibiotics. Roč. 105, Chemical Reviews. 2005. s. 425–48.
- Katayama Y, Ito T, Hiramatsu K. A new class of genetic element, staphylococcus cassette chromosome mec, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000;44(6):1549–55.
- Katayama Y, Murakami-Kuroda H, Cui L, Hiramatsu K. Selection of heterogeneous vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* by imipenem. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53(8):3190–6.
- Katayama Y, Sekine M, Hishinuma T, Aiba Y, Hiramatsu K. Complete reconstitution of the vancomycin-intermediate staphylococcus aureus phenotype of strain mu50 in vancomycin-susceptible *S. aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016;
- Kato Y, Suzuki T, Ida T, Maebashi K, Sakurai M, Shiotani J, et al. Microbiological and clinical study of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) carrying *VraS* mutation: changes in susceptibility to glycopeptides and clinical significance. *Int J Antimicrob Agents*. 2008;
- Khalil H, Williams RJ, Stenbeck G, Henderson B, Meghji S, Nair SP. Invasion of bone cells by *Staphylococcus epidermidis*. *Microbes Infect*. 2007;9(4):460–5.
- Kim JW, Chung GT, Yoo JS, Lee YS, Yoo J II. Autolytic activity and molecular characteristics of *Staphylococcus haemolyticus* strains with induced vancomycin resistance. *J Med Microbiol*. 2012;61(PART 10):1428–34.
- Kim SJ, Cegelski L, Stueber D, Singh M, Dietrich E, Tanaka KSE, et al. Oritavancin Exhibits Dual Mode of Action to Inhibit Cell-Wall Biosynthesis in *Staphylococcus aureus*. *J Mol Biol*. 2008;377(1):281–93.
- Kloos WE, Schleifer KH. Simplified scheme for routine identification of human *Staphylococcus* species. Roč. 1, *Journal of Clinical Microbiology*. 1975. s. 82–8.
- Kornienko M, Ilina E, Lubasovskaya L, Pripitnevich T, Falova O, Sukhikh G, et al. Analysis of nosocomial *Staphylococcus haemolyticus* by MLST and MALDI-TOF mass spectrometry. *Infect Genet Evol*. 2016;39:99–105.
- Kuroda M, Kuroda H, Oshima T, Takeuchi F, Mori H, Hiramatsu K. Two-component system *VraSR* positively modulates the regulation of cell-wall biosynthesis pathway in *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol*. 2003;49(3):807–21.
- Kuroda M, Ohta T, Uchiyama I, Baba T, Yuzawa H, Kobayashi I, et al. Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet (London, England)*. 2001;
- Leadbetter MR, Adams SM, Bazzini B, Fatheree PR, Karr DE, Krause KM, et al. Hydrophobic vancomycin derivatives with improved ADME properties: discovery of telavancin (TD-6424). *J Antibiot (Tokyo)* [Internet]. 2004;57(5):326–36. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15303493>
- Leavis HL, Willems RJL, Van Wamel WJB, Schuren FH, Caspers MPM, Bonten MJM. Insertion sequence-driven diversification creates a globally dispersed emerging multiresistant subspecies of *E. faecium*. *PLoS Pathog*. 2007;3(1):0075–96.
- Leclercq R, Derlot E, Duval J, Courvalin P. Plasmid-Mediated Resistance to Vancomycin and Teicoplanin in *Enterococcus Faecium*. *N Engl J Med* [Internet]. 1988;319(3):157–61. Dostupné z: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJM198807213190307>
- Lee JYH, Monk IR, Pidot SJ, Singh S, Chua KYL, Seemann T, et al. Functional analysis of the first complete genome sequence of a multidrug resistant sequence type 2 *Staphylococcus epidermidis*. *Microb Genomics* [Internet]. 2016;2(9). Dostupné z: <http://www.microbiologyresearch.org/content/journal/mgen/10.1099/mgen.0.000077>
- Liu C, Bayer A, Cosgrove SE, Daum RS, Fridkin SK, Gorwitz RJ, et al. Clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America for the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in

- adults and children. *Clin Infect Dis*. 2011;
- Liu J, Chen D, Peters BM, Li L, Li B, Xu Z, et al. Staphylococcal chromosomal cassettes mec (SCCmec): A mobile genetic element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Microbial Pathogenesis*. 2016.
- Lowy FD. *Staphylococcus aureus* infections. *N Engl J Med*. 1998;
- Lyytikäinen O, Vaara M, Järviluoma E, Rosenqvist K, Tiittanen L, Valtonen V. Increased resistance among *Staphylococcus epidermidis* isolates in a large teaching hospital over a 12-year period. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* [Internet]. 1996;15(0934–9723 SB–M):133–8. Dostupné z: [c:%5CKarsten%5CPDFs%5CStaphylokokken-PDFs%5CStaph-1996%5CLyytikaainen et al.-Increased resistance among Staphylococcus epidermidis isolates in a large teaching hospital over a 12-year period.pdf](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8911111)
- Mack D, Davies AP, Harris LG, Knobloch JKM, Rohde H. *Staphylococcus epidermidis* biofilms: Functional molecules, relation to virulence, and vaccine potential. *Top Curr Chem*. 2009;288:157–82.
- Magiorakos A-P, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect* [Internet]. březem 2012 [citován 3. duben 2018];18(3):268–81. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21793988>
- Mahillon J, Chandler M. Insertion sequences. *Microbiol Mol Biol Rev* [Internet]. 1998;62(3):725–74. Dostupné z: <http://mmbbr.asm.org/content/62/3/725.abstract>
- Matsuo M, Hishinuma T, Katayama Y, Cui L, Kapi M, Hiramatsu K. Mutation of RNA polymerase β subunit (*rpoB*) promotes hVISA-to-VISA phenotypic conversion of strain Mu3. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011;55(9):4188–95.
- Mattsson E, Verhage L, Rollof J, Fleer A, Verhoef J, van Dijk H. Peptidoglycan and teichoic acid from *Staphylococcus epidermidis* stimulate human monocytes to release tumour necrosis factor- α , interleukin-1 beta and interleukin-6. *FEMS Immunol Med Microbiol* [Internet]. 1993;7(3):281–7. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8275059>
- McCallum N, Stutzmann Meier P, Heusser R, Berger-Bächli B. Mutational analyses of open reading frames within the *vraSR* operon and their roles in the cell wall stress response of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011;55(4):1391–402.
- McGuire JM, Wolfe RN, Ziegler DW. Vancomycin, a new antibiotic. II. In vitro antibacterial studies. *Antibiot Annu* [Internet]. 1955 [citován 9. duben 2018];3:612–8. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13355337>
- Mendes RE, Deshpande LM, Costello AJ, Farrell DJ. Molecular epidemiology of *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates from U.S. hospitals. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;
- Miragaia M, Thomas JC, Couto I, Enright MC, De Lencastre H. Inferring a population structure for *Staphylococcus epidermidis* from multilocus sequence typing data. *J Bacteriol*. 2007;189(6):2540–52.
- Mitt P, Metsvaht T, Adamson V, Telling K, Naaber P, Lutsar I, et al. Five-year prospective surveillance of nosocomial bloodstream infections in an Estonian paediatric intensive care unit. *J Hosp Infect*. 2014;
- Monk IR, Shah IM, Xu M. Transforming the Untransformable : Application of Direct. *MBio*. 2012;3(2):e00277-11.
- Monk IR, Tree JJ, Howden BP, Stinear TP, Foster TJ. Complete bypass of restriction systems for major *staphylococcus aureus* lineages. *MBio*. 2015;6(3):1–12.
- Nicolaou KC, Boddy CNC, Bräse S, Winssinger N. Chemistry, Biology, and Medicine of the Glycopeptide Antibiotics. *Angew Chemie Int Ed* [Internet]. 1999;38(15):2096–152. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/%28SICI%291521-3773%2819990802%2938%3A15%3C2096%3A%3AAID->

- Nunes APF, Teixeira LM, Iorio NLP, Bastos CCR, Fonseca L de S, Souto-Pradrón T, et al. Heterogeneous resistance to vancomycin in *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus* and *Staphylococcus warneri* clinical strains: characterisation of glycopeptide susceptibility profiles and cell wall thickening. *Int J Antimicrob Agents*. 2006;27(4):307–15.
- O'Driscoll T, Crank CW. Vancomycin-resistant enterococcal infections: Epidemiology, clinical manifestations, and optimal management. *Infect Drug Resist*. 2015;
- O'Toole G, Kaplan HB, Kolter R. Biofilm Formation as Microbial Development. *Annu Rev Microbiol*. 2000;
- Oliveira WF, Silva PMS, Silva RCS, Silva GMM, Machado G, Coelho LCBB, et al. *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* infections on implants. *J Hosp Infect* [Internet]. únor 2018 [citován 3. březem 2018];98(2):111–7. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0195670117306345>
- Ortwine JK, Werth BJ, Sakoulas G, Rybak MJ. Reduced glycopeptide and lipopeptide susceptibility in *Staphylococcus aureus* and the „seesaw effect”: Taking advantage of the back door left open? *Drug Resist Updat*. 2013;
- Otto M. Virulence Factors of the Coagulase-Negative Staphylococci. *Front Biosci* [Internet]. 2004;9:841–63. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14766414>
- Otto M. Molecular basis of *Staphylococcus epidermidis* infections. Roč. 34, *Seminars in Immunopathology*. 2012. s. 201–14.
- Otto M. *Staphylococcus epidermidis* pathogenesis. *Methods Mol Biol*. 2014;1106:17–31.
- Pacifici GM. Clinical Pharmacology of Teicoplanin in Neonates: Effects and Pharmacokinetics. *Mashhad Univ Med Sci* [Internet]. 1. říjen 2016 [citován 19. dubem 2018];4(10):3669–84. Dostupné z: http://ijp.mums.ac.ir/article_7629.html
- Pereira PM, Filipe SR, Tomasz A, Pinho MG. Fluorescence ratio imaging microscopy shows decreased access of vancomycin to cell wall synthetic sites in vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007;
- Peters G, Locci R, Pulverer G. Adherence and growth of coagulase-negative staphylococci on surfaces of intravenous catheters. *J Infect Dis*. 1982;146(4):479–82.
- Piette A, Verschraegen G. Role of coagulase-negative staphylococci in human disease. *Vet Microbiol* [Internet]. 16. únor 2009 [citován 25. únor 2018];134(1–2):45–54. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378113508003635>
- Reynolds PE. Structure, biochemistry and mechanism of action of glycopeptide antibiotics. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* [Internet]. listopad 1989 [citován 31. březem 2018];8(11):943–50. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2532132>
- Rochon-Edouard S, Pestel-Caron M, Lemeland JF, Caron F. In vitro synergistic effects of double and triple combinations of beta-lactams, vancomycin, and netilmicin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000;
- Rodloff AC, Goldstein EJC, Torres A. Two decades of imipenem therapy. *J Antimicrob Chemother* [Internet]. 6. září 2006 [citován 17. červenec 2018];58(5):916–29. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16997845>
- Rodriguez-Guerineau L, Salvia-Roigés MD, León-Lozano M, Rodríguez-Miguélez JM, Figueras-Aloy J. Combination of vancomycin and rifampicin for the treatment of persistent coagulase-negative staphylococcal bacteremia in preterm neonates. *Eur J Pediatr*. 2013;
- Rossi CC, Ferreira NC, Coelho MLV, Schuenck RP, Bastos M do C de F, Giambiagi-de-Marval M. Transfer of

- mupirocin resistance from *Staphylococcus haemolyticus* clinical strains to *Staphylococcus aureus* through conjugative and mobilizable plasmids. *FEMS Microbiol Lett.* 2016;363(14).
- Scheffers D-J, Pinho MG. Bacterial cell wall synthesis: new insights from localization studies. *Microbiol Mol Biol Rev* [Internet]. prosinec 2005 [citován 1. srpen 2018];69(4):585–607. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16339737>
- Schommer NN, Christner M, Hentschke M, Ruckdeschel K, Aepfelbacher M, Rohde H. *Staphylococcus epidermidis* uses distinct mechanisms of biofilm formation to interfere with phagocytosis and activation of mouse macrophage-like cells 774A.1. *Infect Immun.* 2011;79(6):2267–76.
- Schwalbe RS, Ritz WJ, Verma PR, Barranco E a, Gilligan PH. Selection for vancomycin resistance in clinical isolates of *Staphylococcus haemolyticus*. *J Infect Dis.* 1990;
- Schwalbe RS, Stapleton JT, Gilligan PH. Emergence of vancomycin resistance in coagulase-negative staphylococci. *N Engl J Med.* 1987;
- Shapiro JA, Nguyen VL, Chamberlain NR. Evidence for persisters in *Staphylococcus epidermidis* RP62a planktonic cultures and biofilms. *J Med Microbiol.* 2011;
- Shoji M, Cui L, Iizuka R, Komoto A, Neoh HM, Watanabe Y, et al. *walk* and *clpP* mutations confer reduced vancomycin susceptibility in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;
- Sieradzki K, Tomasz A. Alterations of Cell Wall Structure and Metabolism Accompany Reduced Susceptibility to Vancomycin in an Isogenic Series of Clinical Isolates of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol.* 2003;185(24):7103–10.
- Silva PV, Souza Cruz R, Keim LS, de Paula GR, Ferreira Carvalho BT, Coelho LR, et al. The antimicrobial susceptibility, biofilm formation and genotypic profiles of *Staphylococcus haemolyticus* from bloodstream infections. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2013;108(6):812–6.
- Singh M, Chang J, Coffman L, Kim SJ. Hidden Mode of Action of Glycopeptide Antibiotics: Inhibition of Wall Teichoic Acid Biosynthesis. *J Phys Chem B.* 2017;121(16):3925–32.
- Stefani S, Chung DR, Lindsay JA, Friedrich AW, Kearns AM, Westh H, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): Global epidemiology and harmonisation of typing methods. *International Journal of Antimicrobial Agents.* 2012.
- Stewart PS. Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms. *Int J Med Microbiol.* 2002;
- Svetitsky S, Leibovici L, Paul M. Comparative efficacy and safety of vancomycin versus teicoplanin: Systematic review and meta-analysis. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(10):4069–79.
- Takeuchi F, Watanabe S, Baba T, Yuzawa H, Ito T, Morimoto Y, et al. Whole-genome sequencing of *Staphylococcus haemolyticus* uncovers the extreme plasticity of its genome and the evolution of human-colonizing staphylococcal species. *J Bacteriol.* 2005;187(21):7292–308.
- Treviño J, Bayón C, Ardá A, Marinelli F, Gandolfi R, Molinari F, et al. New insights into glycopeptide antibiotic binding to cell wall precursors using SPR and NMR spectroscopy. *Chem - A Eur J.* 2014;20(24):7363–72.
- Uckay I, Pittet D, Vaudaux P, Sax H, Lew D, Waldvogel F. Foreign body infections due to *Staphylococcus epidermidis*. *Annals of Medicine.* 2009.
- UNMC. Nebraska Transposon Mutant Library. University of Nebraska Medical Center. 2016.
- Urbášková P. Rezistence bakterií k antibiotikům. Praha Trios; 1998.
- Utaiida S, Dunman PM, Macapagal D, Murphy E, Projan SJ, Singh VK, et al. Genome-wide transcriptional profiling of the response of *Staphylococcus aureus* to cell-wall-active antibiotics reveals a cell-wall-stress stimulon. *Microbiology.* 2003;149(10):2719–32.

- Van Bambeke F, Van Laethem Y, Courvalin P, Tulkens PM. Glycopeptide antibiotics: From conventional molecules to new derivatives. *Roč. 64, Drugs*. 2004. s. 913–36.
- Van der Zwet WC, Kaiser AM, van Elburg RM, Berkhof J, Fetter WPF, Parlevliet GA, et al. Nosocomial infections in a Dutch neonatal intensive care unit: Surveillance study with definitions for infection specifically adapted for neonates. *J Hosp Infect*. 2005;
- Vedel G, Leruez M, L??mann F, Hraoui E, Ratovohery D. Prevalence of *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci with decreased sensitivity to glycopeptides as assessed by determination of MICs. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1990;
- Vidaillac C, Gardete S, Tewhey R, Sakoulas G, Kaatz GW, Rose WE, et al. Alternative mutational pathways to intermediate resistance to vancomycin in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis*. 2013;208(1):67–74.
- Vimberg V, Cavanagh JP, Benada O, Kofroňová O, Hjerde E, Zieglerová L, et al. Teicoplanin resistance in *Staphylococcus haemolyticus* is associated with mutations in histidine kinases VraS and Walk. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2018a;90(3):233–40.
- Vimberg V, Kuzma M, Stodu?lková E, Novák P, Bednárová L, Šulc M, et al. Hydnocarpin-Type Flavonolignans: Semisynthesis and Inhibitory Effects on *Staphylococcus aureus* Biofilm Formation. *J Nat Prod*. 2015;
- Vimberg V, Zieglerova L, Závora J, Šemberová L, Prásilová J, Adámková V, et al. Decreased glycopeptide susceptibility in *Staphylococcus pasteurii* associated with a mutation in uncharacterised conserved membrane protein STP1_1701. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*. 2018b.
- Von Eiff C, Heilmann C, Proctor RA, Woltz C, Peters G, Götz F. A site-directed *Staphylococcus aureus* hemB mutant is a small-colony variant which persists intracellularly. *J Bacteriol*. 1997;179(15):4706–12.
- Von Eiff C, Peters G, Becker K. The small colony variant (SCV) concept—the role of staphylococcal SCVs in persistent infections. *Injury*. 2006;37(2 SUPPL.).
- Weigel LM, Clewell DB, Gill SR, Clark NC, McDougal LK, Flannagan SE, et al. Genetic Analysis of a High-Level Vancomycin-Resistant Isolate of *Staphylococcus aureus*. *Science* (80-). 2003;302(5650):1569–71.
- Widerström M, Monsen T, Karlsson C, Wiström J. Molecular epidemiology of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci in a Swedish county hospital: evidence of intra- and interhospital clonal spread. *J Hosp Infect* [Internet]. říjen 2006 [citován 31. březem 2018];64(2):177–83. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S019567010600301X>
- Wootton M. A modified population analysis profile (PAP) method to detect hetero-resistance to vancomycin in *Staphylococcus aureus* in a UK hospital. *J Antimicrob Chemother* [Internet]. 2001;47(4):399–403. Dostupné z: <https://academic.oup.com/jac/article-lookup/doi/10.1093/jac/47.4.399>
- Yamakawa J, Aminaka M, Okuzumi K, Kobayashi H, Katayama Y, Kondo S, et al. Heterogeneously vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* (hVISA) emerged before the clinical introduction of vancomycin in Japan: A retrospective study. *J Infect Chemother*. 2012;
- Zhanell GG, Calic D, Schweizer F, Zelenitsky S, Adam H, Lagac-Wiens PRS, et al. New lipoglycopeptides: A comparative review of dalbavancin, oritavancin and telavancin. *Roč. 70, Drugs*. 2010. s. 859–86.