

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2011

Jana Hoffmannová

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra buněčné biologie a genetiky



**Výskyt faktorů virulence u izolátů *Staphylococcus aureus*
od pacientů s vybranými diagnózami**

Bakalářská práce

Jana Hoffmannová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2011

Vedoucí práce: Mgr. Pavel Sauer, Ph.D.

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením
Mgr. Pavla Sauera, Ph.D. s použitím uvedených literárních zdrojů.

V Olomouci dne

.....

Ráda bych poděkovala svému školiteli Mgr. Pavlovi Sauerovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a doporučení při zpracování bakalářské práce. Dále děkuji MUDr. Ivě Vágnerové, Ph.D. za poskytnutí izolátů *Staphylococcus aureus* a klinických údajů o pacientech. Také bych chtěla poděkovat kolektivu pracovníků Laboratoře molekulárně biologické na Ústavu mikrobiologie za ochotu a pomoc, kterou mi poskytli při práci v laboratoři.

SOUHRN

Staphylococcus aureus patří k nejproblematictějším oportunním patogenům. Běžně se vyskytuje na kůži a sliznicích značné části lidské populace, při poruchách přirozené odolnosti je však schopen způsobit velmi vážná onemocnění. Kmeny produkující významné faktory virulence - extracelulární toxiny představují zvýšenou hrozbu zejména u nozokomiálních infekcí.

Cílem bakalářské práce bylo určit frekvenci výskytu extracelulárních toxinů u izolátů *Staphylococcus aureus*, získaných od pacientů hospitalizovaných ve Fakultní nemocnici Olomouc v rozmezí let 2009 až 2011. Druhým bodem práce bylo získat přehled o vztahu zjištěných pozitivních izolátů k diagnóze a závažným klinickým stavům.

Izoláty *Staphylococcus aureus* byly pomocí polymerázové řetězové reakce testovány na přítomnost genů kódujících čtyři extracelulární toxiny - Pantonův-Valentinův leukocidin, exfoliativní toxin A, exfoliativní toxin B a toxin-1 syndromu toxického šoku. Ze souboru 97 vzorků bylo pouze 10,3 % pozitivních na jeden ze studovaných genů, gen *etb* nebyl detekován u žádného z izolátů. Vztah pozitivních izolátů k závažným diagnózám nebyl jednoznačně prokázán a u pacientů nebylo pozorováno zhoršení zdravotního stavu v důsledku působení detekovaného toxinu. Výsledky naznačují, že výskyt izolátů *Staphylococcus aureus* pozitivních na sledované geny byl ve Fakultní nemocnici Olomouc velmi nízký a žádný z nich nepředstavoval zvýšené riziko pro hospitalizované pacienty.

SUMMARY

Staphylococcus aureus belongs to the most problematic opportunistic pathogens. It is commonly found on skin and mucous membranes in considerable part of the human population, however, it is able to cause very serious illness in disorders of natural resistance. Strains producing significant virulent factors - extracellular toxins represent an increased threat especially in the case of nosocomial infections.

The aim of bachelor work was to determine frequency of prevalence of extracellular toxins in *Staphylococcus aureus* isolates, obtained from patients hospitalized at the University Hospital in Olomouc during 2009-2011. The second point of the study was to gain insight about the relation of detected positive isolates to the diagnosis and the serious clinical conditions.

Staphylococcus aureus isolates was screened by polymerase chain reaction to present genes encoding four extracellular toxins - Panton-Valentine leukocidin, exfoliative toxin A, exfoliative toxin B and toxic shock syndrome toxin-1. From the collection of 97 samples was only 10,3 % positive for one of the studied genes, *etb* gene was not detected in any of the isolates. The relation of the positive isolates to serious diagnosis was not conclusively proved and impairment in health condition due to the effect of the detected toxin was not observed in patients. The outcomes suggest that prevalence of *Staphylococcus aureus* isolates positive for observed genes was in the University Hospital in Olomouc very low and none of them did not represent an increased risk for hospitalized patients.

OBSAH

1	ÚVOD	9
2	CÍLE PRÁCE.....	10
3	LITERÁLNÍ PŘEHLED	11
3.1	Rod <i>Staphylococcus</i>	11
3.1.1	<i>Staphylococcus aureus</i>	12
3.2	Faktory virulence <i>Staphylococcus aureus</i>	13
3.2.1	Povrchové faktory virulence.....	13
3.2.2	Extracelulární faktory virulence - enzymy	14
3.2.2.1	Penicilináza a rezistence k antibiotikům	15
3.2.3	Extracelulární faktory virulence - toxiny.....	16
3.2.3.1	Cytolyziny	16
3.2.3.1.1	Pantonův-Valentinův leukocidin	17
3.2.3.2	Exfoliativní toxiny	19
3.2.3.3	Stafylokokové enterotoxiny.....	21
3.2.3.4	Toxin-1 syndromu toxického šoku	24
3.3	Metody detekce extracelulárních toxinů <i>Staphylococcus aureus</i>	27
3.3.1	Imunologické metody detekce.....	27
3.3.2	Molekulárně biologické metody detekce.....	29
4	MATERIÁL A METODY	33
4.1	Biologický materiál	33
4.2	Kultivace <i>S. aureus</i> a izolace DNA	35
4.3	Detekce genů pomocí jednoduché PCR	36
4.3.1	PCR amplifikace DNA	36
4.3.2	Elektroforéza a vizualizace výsledků	38
4.4	Seznam použitých chemikálií a roztoků	39
4.5	Seznam použitých laboratorních přístrojů	39

5	VÝSLEDKY	40
5.1	Izolace DNA z izolátů <i>S. aureus</i>	40
5.2	Detekce genů <i>pvl</i> , <i>tst</i> , <i>eta</i> , <i>etb</i> pomocí jednoduché PCR.....	40
5.2.1	Zjištěný výskyt genů <i>pvl</i> , <i>tst</i> , <i>eta</i> , <i>etb</i> u studovaných izolátů	40
5.2.2	Charakteristika izolátů <i>S. aureus</i> pozitivních na testované geny	44
6	DISKUZE	46
6.1	Výskyt genů <i>pvl</i> , <i>tst</i> , <i>eta</i> a <i>etb</i> mezi izoláty <i>S. aureus</i>	46
6.2	Vztah izolátů pozitivních na detekované geny k diagnóze a stavu pacientů.....	47
7	ZÁVĚR	49
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	50
9	LITERATURA	52

1 ÚVOD

Staphylococcus aureus patří mezi hojně vyskytující se oportunní patogeny běžně kolonizující kůži a sliznici až třetiny zdravé populace. Avšak v případě i sebemenší poruchy přirozené odolnosti vyvolává onemocnění sahající od banálních kožních infekcí až po smrtelně probíhající sepsi. Na rozvoji stafylokokových infekcí se podílí povrchové faktory virulence (adheziny, polysacharidové pouzdro a další), které se uplatňují především při adhezi na sliznice, kůži a rány. Jiné (protein A) hrají roli v potlačení specifické imunitní odpovědi hostitele. Dále *S. aureus* produkuje enzymatické extracelulární faktory virulence, které usnadňují šíření bakterie do okolních tkání (hyaluronidáza) nebo jsou příčinou rezistence vůči penicilinu (penicilináza).

Vysoké riziko, zejména v nemocničním prostředí, představují kmeny s produkcí toxinů jako extracelulárních faktorů virulence. K hlavním skupinám těchto toxinů patří cytolyziny, ke kterým se řadí Pantonův-Valentinův leukocidin (PVL), způsobující jak kožní léze a abscesy, tak i život ohrožující nekrotizující pneumonie. Další skupinou jsou exfoliativní toxiny vyvolávající různě těžká poškození kůže. Poslední skupinu tvoří pyrogenní superantigenní toxiny zahrnující stafylokokové enterotoxiny (SEs) považované za hlavní příčinu otravy potravinami a toxin-1 syndromu toxického šoku (TSST-1) způsobující závažné onemocnění zvané syndrom toxického šoku. Vzhledem k uvedeným více či méně závažným zdravotním rizikům je považováno za důležité sledovat výskyt těchto toxinů, především v rámci nemocnic. Daný toxin může být detekován přímo - imunologickými metodami pomocí specifických protilátek nebo molekulárně biologickými metodami založenými na detekci genů kódujících toxiny.

V souvislosti s nozokomiálními infekcemi je také nutné upozornit na další významně nebezpečný faktor v podobě rezistence vůči polysyntetickým penicilinům, která znemožňuje úspěšnou léčbu stafylokokových infekcí. Sledování výskytu MRSA (methicilin-rezistentní *S. aureus*) kmenů však nebylo hlavním tématem bakalářské práce.

Praktická část práce se zabývá detekcí genů kódujících extracelulární toxiny PVL, ETA (exfoliativní toxin A), ETB (exfoliativní toxin B) a TSST-1 pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) u izolátů *S. aureus*. Cílem bylo zjistit četnost výskytu izolátů pozitivních na detekované geny v rámci Fakultní nemocnice Olomouc v rozmezí let 2009 až 2011. Dále byl zkoumán vztah pozitivních izolátů k diagnóze a závažným klinickým stavům pacientů, od kterých byl vzorek získán.

2 CÍLE PRÁCE

1. Vypracovat literární rešerši na téma faktory virulence a metody detekce extracelulárních toxinů vyskytujících se u druhu *Staphylococcus aureus*.
2. U pacientů s těžkými klinickými stavy a s výskytem *Staphylococcus aureus* provést detekci genů kódujících produkci faktorů virulence - extracelulárních toxinů pomocí PCR.
3. Vyhodnotit zjištěné četnosti genů kódujících extracelulární toxiny u izolátů *Staphylococcus aureus* a získat přehled jejich vztahu k diagnóze a závažným klinickým stavům ve Fakultní nemocnici Olomouc.

3 LITERÁLNÍ PŘEHLED

3.1 Rod *Staphylococcus*

Rod *Staphylococcus* zahrnuje grampozitivní koky o průměru kolem 1 μm , které tvoří nepravidelné shluky tvaru hroznů (z řečtiny *staphylé* = hrozen), jsou fakultativně anaerobní, nesporulující, nepohyblivé, většinou neopouzdřené a produkující enzym katalázu (Votava a Černohorská, 2003). Podle nejnovějších studií se taxonomicky zařazuje do říše *Bacteria* (nebo *Eubacteria*), kmene *Firmicutes*, třídy *Bacilli*, řádu *Bacillales*, čeledi *Staphylococcaceae* (Euzéby, 2010).

Většinou se jedná o oportunní patogeny, běžně kolonizující kůži, popř. nosní sliznici (*Staphylococcus aureus*) zdravých jedinců. Infekce se projevuje pouze tehdy, je-li pacient nějakým způsobem oslaben, např. operací, kožním traumatem, imunitním onemocněním, přítomností cizího tělesa - intravaskulární katetry, implantáty, protézy a podobně (Ryšková a kol., 2004). Mají význam především u nozokomiálních infekcí (infekcí, které se vyskytují v nemocnici), na jednotkách intenzivní péče v Evropě způsobují až polovinu infekčních komplikací (Koukalová a kol., 2005).

Podle Euzéby (2010) je do rodu *Staphylococcus* v současné době zařazováno 44 druhů a 24 poddruhů. V závislosti na produkci enzymu koaguláza, koagulující krevní plazmu, se dělí na koagulázapozitivní a koagulázanegativní druhy.

Z medicínského hlediska patří mezi nejdůležitější koagulázanegativní druhy stafylokoků (KNS) *Staphylococcus epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis* a *S. warneri*. Jedná se o druhy, které jsou součástí normální mikroflóry kůže a sliznic člověka. S rozvojem medicíny se však stále častěji používají polymerní implantáty, intravaskulární kanyly, močové katétry a náhrady (umělých kloubů, cévních štěpů, náhrady chlopní), které mohou být kolonizovány KNS, které se potom mohou projevit jako patogeny a způsobovat infekce (Arbuthnott, 1999).

Nejdůležitějším koagulázapozitivním druhem uplatňujícím se v humánní patologii je *Staphylococcus aureus*. Další druhy jsou spíše zvířecího původu a u člověka se vyskytují jen výjimečně (Votava a Černohorská, 2003).

3.1.1 *Staphylococcus aureus*

V přírodě se vyskytují dva poddruhy - *S. aureus* subsp. *aureus* a *S. aureus* subsp. *anaerobius*. Protože se druhý uvedený poddruh u člověka nevyskytuje, bude pojednáváno pouze o *S. aureus* subsp. *aureus* (dále jen *S. aureus*).

S. aureus patří mezi poměrně rezistentní bakterie k zevnímu prostředí, odolává teplotám okolo 60°C i vysychání, především v hnisu (Votava a Černohorská, 2003). S tím souvisí i možnosti jeho kultivace. Protože je odolný vůči větší koncentraci soli, používá se k jeho selekci krevní agar s 7-10% NaCl, kde vyrůstá přibližně za 24 hodin při 37°C v okrouhlé pigmentované (zlatožluté, smetanové) kolonie s hladkým lesklým povrchem a s hemolýzou v okolí (Arbuthnott, 1999).

S. aureus patří k nejproblematictějším lidským patogenům, vyvolává řadu onemocnění od banálních kožních infekcí přes závažné záněty vnitřních orgánů až po smrtelně probíhající sepse (Votava a Černohorská, 2003). Většina infekcí souvisí s produkcí faktorů virulence (viz dále).

3.2 Faktory virulence *Staphylococcus aureus*

Faktory virulence jsou obecně látky produkované patogeny, které se účastní vzniku a vývoje určité choroby (patogeneze). K projevení infekce většinou nestačí přítomnost jednoho faktoru, každý faktor má svoji roli v různých fázích onemocnění a jejich různé soubory mohou vyvolávat různé projevy onemocnění (Arbuthnott, 1999).

V genomu *S. aureus* se nachází velké množství transpozonů, inzerčních sekvencí a profágů. Tyto různě velké a potenciálně pohyblivé sekvence DNA obsahují geny kódující faktory virulence a jsou přenášeny horizontálně mezi kmeny (Votava a Černohorská, 2003).

Produkce většiny stafylokokových faktorů virulence je řízena skupinou genů na lokusu *agr* (*accessory gene regulator*). Díky aktivitě těchto genů jsou bakterie schopné reagovat na hustotu populace ve svém okolí a regulovat tak produkci faktorů virulence v závislosti na fázi růstu. Locus *agr* se skládá ze dvou operonů a zahrnuje nejméně čtyři geny: *agrA*, *agrB*, *agrC*, *agrD* a gen pro delta-hemolysin, který kromě regulační funkce kóduje cytolyzin delta-hemolysin (Vasconcelos a Cunha, 2010).

Podle Votavy a kol. (2003) lze faktory virulence u druhu *S. aureus* dělit na povrchové (antigeny buněčné stěny) a extracelulární (enzymy a toxiny).

3.2.1 Povrchové faktory virulence

Mezi povrchové faktory virulence *S. aureus* patří peptidoglykan, teichoová kyselina, adheziny, protein A, polysacharidové pouzdro a další.

Na povrchu buněk *S. aureus* se nachází buněčná stěna, která je tvořena mohutnou vrstvou peptidoglykanu (mureinu), skrze níž až na povrch pronikají lineární řetězce teichoových kyselin. Peptidoglykan je složen z polysacharidových řetězců, které jsou prostřednictvím tetrapeptidů charakteristicky spojeny pentaglycinovými spojovacími můstky. Jako faktor virulence stimuluje uvolňování cytokinů z makrofágů a lymfocytů, aktivaci komplementu a shlukování krevních destiček (Votava a Černohorská, 2003). Aktivuje tak nespecifickou imunitu hostitele, což se projeví cytotoxickými účinky a lokální zánětlivou reakcí v kůži (Bednář a kol., 1996). Kyselina teichoová (polysacharid A) je polymer ribitolfosfátu a projevuje se jako skupinově specifický antigen uplatňující se v adhezi na sliznice a rány (váže se na fibronectin) (Votava a Černohorská, 2003).

Na peptidoglykan jsou kromě kyseliny teichoové navázány další specifické proteiny, tzv. adheziny, které zprostředkovávají vazbu bakterií k mezibuněčným (fibrinogenu, fibronektinu, kolagenu) nebo buněčným (lamininu, sialoproteinu) strukturám hostitele, čímž podporují kolonizaci kůže a sliznic (Bednář a kol., 1996). Například vázaná koaguláza neboli clumping faktor vyvolává shlukování buněk *S. aureus* přeměnou fibrinogenu na fibrin (Votava a Černohorská, 2003). Další adhezin, fibronektin vázající protein, může představovat první krok v kolonizaci hostitelských tkání a v následném rozvoji infekce (Jönsson a kol., 1991). Kmeny *S. aureus*, které produkují adhezin vázající kolagen, adherují na tkáně bohaté na kolagen, chrupavky, kosti a v neposlední řadě na ortopedické protézy in vivo pokryté hostitelskými proteiny. Proto jsou tyto kmeny často příčinou rozvoje osteomyelitidy, septické artritidy a infekcí spojených s ortopedickými protézami (Montanaro a kol., 1999). Podle Montanaro a kol. (1999) hraje roli v patogenezi těchto chorob také schopnost produkce polysacharidového slizu a následné vytváření biofilmu na umělém povrchu. Tvorba biofilmu je však charakteristická spíše pro *S. epidermidis*, druhého hlavního oportunního patogena rodu *Staphylococcus* (O'Gara a Humphreys, 2001; Gill a kol., 2005).

Součástí buněčné stěny *S. aureus* je dále protein A, společný skupinový antigen většiny kmenů. Má schopnost nespecificky reagovat s Fc-fragmentem imunoglobulinů IgG a částečně i IgM a IgA. Jeho molekula obsahuje čtyři opakující se aktivní domény s identickou sekvencí aminokyselin, je tedy schopná vázat více než jednu molekulu protilátky. Soutěží o Fc-fragment imunoglobulinu s Fc-receptory na povrchu fagocytů. Brání opsonizaci bakterie, tj. navázání imunoglobulinů, které umožňují nebo zlepšují její pohlčení fagocyty. Působí také proti komplementu (Bednář a kol., 1996).

3.2.2 Extracelulární faktory virulence - enzymy

S. aureus produkuje řadu extracelulárních enzymů jako je koaguláza, kataláza, hyaluronidáza, stafylokináza, lipázy, nukleázy, penicilináza a další.

K jednoduchým proteinům s enzymatickou aktivitou patří koaguláza, jejíž detekce se používá k identifikaci koagulázapozitivních stafylokoků, pro které je její přítomnost charakteristická. Tento enzym vytváří s prothrombinem v plazmě stafylothrombin, katalyzující přeměnu rozpustného fibrinogenu na pevný fibrin. Předpokládá se, že bakterie pokryté fibrinem jsou rezistentní vůči fagocytům a tím zvyšují svoji virulenci. Každopádně

je tvorba fibrinu důvodem, proč infekce vyvolané *S. aureus* probíhají obvykle formou ohraničených ložisek - abscesů. Dalším charakteristickým enzymem, produkovaným všemi zástupci rodu *Staphylococcus*, je kataláza štěpící toxický peroxid vodíku (Votava a Černohorská, 2003).

Enzymem, který se pro svoji funkci označuje jako faktor šíření (spreading factor) je hyaluronidáza. Štěpí kyselinu hyaluronovou přítomnou v mezibuněčném tmelu, což usnadňuje šíření *S. aureus* a jeho toxinů do okolních tkání. Má nízkou imunogenicitu (schopnost vyvolat imunitní odpověď), specifické protilátky se nacházejí jen u nízkého procenta nemocných. K dalším enzymům, které se také podílí na šíření stafylokokové infekce, patří stafylokináza (neboli fibrinolysin) a lipázy. Stafylokináza iniciuje přeměnu proenzymu plasminogenu na proteolytický plasmin, který rozpouští fibrinové sraženiny (Bednář a kol., 1996). Lipázy hydrolyzují lipidy a usnadňují tak šíření do podkoží a mazových žláz (Votava a Černohorská, 2003; Ryšková a kol., 2004).

S. aureus také produkuje nukleázy, které jsou vysoce termorezistentní, odolávají zahřátí až na 100°C po dobu více jak 15 minut. Jsou pravděpodobně schopny napadat jádra leukocytů, kde katalyzují odštěpení fosfomononukleozidů z deoxyribonukleové kyseliny (Bednář a kol., 1996; Votava a Černohorská, 2003).

3.2.2.1 Penicilináza a rezistence k antibiotikům

Antibiotika penicilinové povahy obecně inhibují enzym transpeptidázu účastnící se výstavby buněčné stěny, dochází tak k narušení povrchu buňky a bakterie lýzují. V současnosti je však přes 90 % kmenů *S. aureus* rezistentní k penicilinu, protože obsahují plazmid nesoucí geny kódující penicilinázu (beta-laktamázu). Tento enzym štěpí čtyřčlenný beta-laktamový kruh a inaktivuje tak penicilinová (beta-laktamová) antibiotika.

Většina kmenů v České republice ale naštěstí stále zůstává citlivá na polosyntetické, penicilinázorezistentní peniciliny (oxacilin, cloxacilin, methicilin). Do molekul těchto penicilinů byla vnesena vhodná skupina bránící přístupu penicilinázy k citlivému místu na beta-laktamovém kruhu.

Stále častěji se ovšem objevují kmeny rezistentní i k těmto upraveným penicilinům, označují se zkratkou MRSA (methicilin-rezistentní *S. aureus*). Podstatou této rezistence je nejčastěji přítomnost genu *mecA* kódujícího pozměněnou transpeptidázu, která je odolná vůči působení penicilinů (Votava a Černohorská, 2003). MRSA kmeny se vyskytují

převážně ve zdravotnických zařízeních, kde způsobují nebezpečné nozokomiální infekce. Obvykle jsou kromě penicilinových antibiotik rezistentní i na řadu dalších, jako jsou například makrolidy, tetracykliny, fluorochinolony nebo chloramfenikol. Představují proto u infikovaných oslabených pacientů vážný terapeutický problém (Bednář a kol., 1996; Votava a Černohorská, 2003).

3.2.3 Extracelulární faktory virulence - toxiny

S. aureus produkuje řadu extracelulárních toxinů, jako jsou cytolyziny (hemolyziny a Pantónův-Valentinův leukocidin), exfoliativní toxiny (ETA, ETB), stafylokokové enterotoxiny (SEA, SEB a další), toxin-1 syndromu toxického šoku (Votava a Černohorská, 2003). Kmeny *S. aureus* mohou produkovat jeden nebo více těchto toxinů, které výrazně ovlivňují jejich virulenci a tím klinické projevy hostitele (Dinges a kol., 2000).

3.2.3.1 Cytolyziny

Do této skupiny extracelulárních toxinů patří čtyři hemolyziny (alfa, beta, gama, delta-hemolyzin) a Pantónův-Valentinův leukocidin (PVL). Jejich společnou vlastností je poškozování povrchových membrán buněk hostitele (Votava a Černohorská, 2003).

K nejvíce prozkoumaným stafylokokovým cytolyzinům patří alfa-hemolyzin (též alfa-toxin). Produkuje ho většina kmenů *S. aureus* a je toxický pro širokou škálu savčích buněk. Monomery alfa-hemolyzinu sekretované stafylokoky se integrují do membrány cílové buňky, kde formují cylindrické hexametry zodpovědné za perforaci membrány. U některých buněk vyvolávají jejich lýzu, například králičích erytrocytů, dochází k úplné hemolýze, které se využívá při identifikaci *S. aureus* a typu hemolyzinu. Póry se však nemusejí nacházet u všech citlivých buněk, například fibroblasty jsou schopny opravit membrány poškozené nízkými dávkami alfa-toxinu. Příčina chorobných stavů člověka způsobených alfa-hemolyzinem při infekcích *S. aureus* spočívá především ve změně iontové rovnováhy ve vnitřním prostředí organismu. To může vést až k plicnímu edému nebo syndromu dechové tísně u dospělých. Alfa-toxin se také vyznačuje dermonekrotickými a neurotoxickými účinky u různých druhů živočichů. Neurotoxita byla pozorována například u králíků a myši (Bednář a kol., 1996; Dinges a kol., 2000).

Antagonisticky vůči alfa-hemolyzinu působí beta-hemolyzin. Ten je ve velké míře produkován kmeny *S. aureus* zejména zvířecího původu. Působí jako fosfolipáza C na sfingomyelin v membránách erytrocytů. Nejcitlivěji reagují krvinky ovčí, protože obsahují ve své membráně nejvíce sfingomyelinu, naopak na králičí erytrocyty působí nejméně. Na agaru s ovčími krvinkami způsobuje tzv. *hot-cold hemolysis*, neúplnou hemolýzu vyvolanou účinkem chladu. Při kultivační teplotě 37°C dochází ke štěpení sfingomyelinu na ceramid a fosforylcholin v membráně erytrocytů, tím se změní její stabilita, ale celistvost zůstává zachována, k hemolýze dochází až při ochlazení pod 10°C (Bednář a kol., 1996; Dinges a kol., 2000; Votava a Černohorská, 2003).

Beta-hemolyzin zesiluje účinek delta-hemolyzinu, který produkuje většina kmenů *S. aureus* a některé jiné druhy stafylokoků. Jako povrchově aktivní látka narušuje membrány a tím způsobuje lýzu různých druhů savčích buněk, makrofágů, lymfocytů a hlavně lidských erytrocytů. Aktivitu delta-hemolyzinu inhibují sérové fosfolipidy, proto mohou být kmeny při kultivaci na krevním agaru chybně označeny za nehemolytické (Bednář a kol., 1996; Votava a Černohorská, 2003).

Mezi dvousložkové cytolyziny patří gama-hemolyzin a Pantonův-Valentinův leukocidin. Oba toxiny jsou sekretovány stafylokoky jako dva samostatné proteiny, označované jako pomalá S (slow) a rychlá F (fast) složka, podle jejich relativní rychlosti při chromatografické frakcionaci. Jednotlivě tyto složky nemají žádný biologický význam, aktivní jsou pouze při současném účinku.

Gama-hemolyzin je méně toxický než alfa-hemolyzin a tvoří ho téměř všechny kmeny *S. aureus*. Nejcitlivěji na něj reagují erytrocyty králičí, na krevním agaru se ale prokázat nedá, protože gama hemolýza je agarem inhibována.

3.2.3.1.1 Pantonův-Valentinův leukocidin

Pantonův-Valentinův leukocidin je podobně jako gama-hemolyzin tvořen dvěma složkami, ale procento kmenů *S. aureus*, které ho produkují je podstatně nižší, cca 2 % (Bednář a kol., 1996; Dinges a kol., 2000). Je kódován profágem ϕ PVL (virem integrovaným do genomu stafylokoků), který obsahuje geny *lukS-PV* a *lukF-PV* kódující dvě složky toxinu (Heinige a kol., 2009).

PVL je cytolyzin, který se na rozdíl od hemolyzinů nevyznačuje primárně lýzou erytrocytů, ale leukocytů. Jeho dvě složky, LukS-PV a LukF-PV o velikosti cca 33,5 kDa, se kompletují v buněčné membráně neutrofilů a makrofágů, perforují je a naruší tak jejich

permeabilitu a iontovou výměnu (Bednář a kol., 1996; Heinige a kol., 2009). Po lýze poškozených leukocytů se jejich buněčný obsah obsahující lytické složky uvolní do okolní tkáně a způsobí její destrukci (Heinige a kol., 2009). Snížený počet těchto imunitních buněk také vede k neschopnosti pacienta účinně se bránit bakteriální infekci fagocytózou (Petráš a kol., 2009).

Kmeny *S. aureus* produkující PVL často způsobují kožní léze a abscesy (zánětem vzniklé ohraničené nekrotické dutiny plné hnisu). Nejčastěji se tvoří furunkly, abscesy vzniklé rozšířením zánětu vlasového míšku nebo mazových žlázek do škáry. Většina těchto abscesů vyžaduje v první řadě chirurgickou incisi, vypuštění hnisu a následnou drenáž, aby mohl hnis odtékat. Současně je léčba doprovázena podáváním vhodných antibiotik. Zvláště nebezpečné jsou furunkly v okolí nosu a na rtech. Odtud se infekce může venózními cestami rozšířit až k mozkovým plenám (Bednář a kol., 1996; Votava a Černohorská, 2003; Issartel a kol., 2005).

Experimenty provedenými na králících bylo zjištěno, že podání čistého PVL vyvolá závažné zánětlivé léze, kapilární dilataci a nekrózy jak u neporušené tak poškozené kůže (Issartel a kol., 2005). V důsledku těchto vlastností, způsobují kmeny *S. aureus* produkující PVL mnohočetné furunkly s výrazným zarudnutím kolem léze, odrážející tak silný zánět způsobený lýzou leukocytů a kapilární dilataci. Obecně se předpokládá, že pacienti s některými systémovými chorobami jako je diabetes nebo imunosuprese jsou náchylnější k rozvoji této infekce, ale pro tuto teorii nejsou k dispozici žádné důkazy. Naopak současné poznatky potvrzují, že onemocnění většinou postihuje zdravé starší děti a mladé dospělé (Yamasaki a kol., 2005a). Ze zánětlivých lézí mohou kmeny *S. aureus* produkující PVL proniknout do krevního řečiště a způsobit tak bakteriemii (přítomnost bakterií v krvi), která může vést až k celkové sepsi (Bednář a kol., 1996; Yamasaki a kol., 2005a).

Mezi velmi závažná onemocnění způsobená kmeny *S. aureus* produkující PVL patří vedle těžkých kožních infekcí také nekrotizující pneumonie s rychlým, dramatickým průběhem, která i přes adekvátní léčbu může vést ke smrti pacienta. Může postihovat do té doby zdravé děti a mladé dospělé, častěji se ale onemocnění vyvíjí po prodělání respirační virózy (Heinige a kol., 2009; Petráš a kol., 2009). *S. aureus* nasedá na poškozený epitel dolních cest dýchacích, dochází k sekundárnímu zápalu plic (pneumonii), postupně se rozvíjí septický šok a následně multiorgánové selhání (Petráš a kol., 2009).

Volba vhodné antibiotické léčby je při léčení infekcí spojených s produkcí PVL velmi důležitá. Dumitrescu a kol. (2008) totiž prokázali, že sub-inhibiční koncentrace antibiotické látky oxacilinu zvyšuje produkci PVL, a to až 2,5krát, naopak jiné látky

produkci snižují (clindamycin, linezolid, kyselina fusidová, rifampicin) a některé nemají na produkci PVL vliv (vancomycin, pristinamycin, tetracyklin, ofloxacin, cotrimoxazol). Podle tohoto výzkumu spočívá nejúčinnější antibiotická léčba infekcí způsobených PVL pozitivním kmenem *S. aureus* v podávání oxacilinu v kombinaci s clindamycinem, rifampicinem nebo linezolidem.

3.2.3.2 Exfoliativní toxiny

S. aureus produkuje nejméně čtyři antigenně odlišné sérotypy této skupiny extracelulárních toxinů - exfoliativní toxin A (ETA), exfoliativní toxin B (ETB), exfoliativní toxin C (ETC) a exfoliativní toxin D (ETD). ETC byl prokázán u koní s kožní infekcí, ostatní exfoliativní toxiny (ETs) vyvolávají různě těžká poškození lidské kůže. ETA a ETB jsou zodpovědné za většinu případů stafylokokového syndromu opárené kůže (SSSS, *staphylococcal scalded skin syndrome*). ETD není podle Yamaguchi a kol. (2002) přímo spojen s SSSS, ale hraje jinou roli při stafylokokových infekcích, jako je narušení kožní epiteliální bariéry a umožnění šíření infekce.

ETA je kódován genem (*eta*) lokalizovaným na profágu chromozomu *S. aureus*, jeho molekulová hmotnost činí 26,95 kDa a vyznačuje se tepelnou stabilitou. Zatímco ETB je kódován genem (*etb*) umístěným na plazmidu a je tepelně labilní, jeho molekulová hmotnost je přibližně stejná (27,27 kDa). Oba toxiny (ETA, ETB) vykazují enzymatickou aktivitu, působí jako, ač netypické, serinové proteázy skládající se ze dvou domén (S1 a S2). V nativním stavu je blokováno jejich aktivní místo, které se uvolní po vazbě specifické sekvence na epidermální receptor. Tím umožní vazbu substrátu, kterým je desmoglein-1. Tento transmembránový desmosomální glykoprotein z rodiny kadherinů hraje důležitou roli při intracelulární adhezi keratinocytů ve třetí vrstvě epidermis (granulární vrstva, stratum granulosum). Vyskytuje se jak ve svrchních vrstvách pokožky (granulární vrstvě), tak ve spodní epidermis. Ve spodní epidermis se ovšem také nachází desmoglein-3, který ETs neštěpí a v případě degradace desmogleinu-1 přebírá jeho funkci. Rozštěpením desmogleinu-1 proto dochází především ve svrchních vrstvách pokožky k formování puchýřů, typických pro kožní infekce způsobené kmeny *S. aureus* produkující ETs (Yamaguchi a kol., 2002; Ladhani, 2003; Yamasaki a kol., 2005b).

Podle Monday a kol. (1999) mají ETs také superantigenní vlastnosti. Napojují se přímo na vazebné molekuly hlavního histokompatibilního komplexu třídy II (MHC II) na

povrchu antigen prezentující buňky (APC), který prostřednictvím vazby spojuje s variabilním úsekem V β řetězce receptoru T lymfocytů (TCR) (Bednář a kol., 1996; Ladhani, 2003). Tato interakce pak indukuje velké množství T lymfocytů k nadprodukci cytokinů způsobujících systémovou toxicitu (Bednář a kol., 1996; Vasconcelos a Cunha, 2010). ETA nemá letální účinky a je jen minimálně pyrogenní. ETB je více pyrogenní a zvyšuje pravděpodobnost letálního šoku u králíků, podobně jako TSST-1, klasický člen PTSAg rodiny, o které bude pojednáváno v následujících dvou kapitolách (Monday a kol., 1999). Ačkoliv existuje jen málo důkazů o zapojení superantigenicity ETs do patogeneze SSSS, mohou v důsledku této vlastnosti hrát roli u jiných onemocnění, jako je atopická dermatitida, lupénka a podobně (Ladhani, 2003).

SSSS se vyskytuje ve dvou klinických formách. Lokalizovaná forma SSSS, neboli bulózní impetigo je častější a může se projevit v každém věku (Yamasaki a kol., 2005b). *S. aureus* pronikne porušenou kožní bariérou do organismu a v místě vstupu vyvolá tvorbu puchýřů naplněných průhlednou až hnisavou tekutinou. Šíření krevní cestou je ale v tomto případě omezeno přítomností protilátek proti ETs. Proto onemocnění může propuknout i u starších pacientů, kdy jsou již protilátky vytvořeny (Ladhani, 2003).

Naproti tomu generalizovaná forma SSSS postihuje především novorozence (Ritterova choroba), kojence a malé děti (Yamasaki a kol., 2005b). Zřídka se projevuje u dospělých, kde bývá její výskyt spojen s jiným onemocněním, zejména imunodeficiencí či selháním ledvin. V krevním řečišti mladého pacienta je nedostatek protilátek proti ETs, což toxinům umožní proniknout z krve do epidermis a způsobit charakteristické poškození. Dalším faktorem, který odpovídá za častý výskyt tohoto onemocnění u malých dětí je nedostatečná funkce ledvin a tím i nedostatečné vylučování toxinu z organismu. *S. aureus* vstupuje do krevního řečiště buď z běžně kolonizovaných míst, nebo infekčních ran a abscesů, často nebývá ohnisko vůbec nalezeno. Vytváří se velké křehké povrchové puchýře, které při sebemenším tlaku praskají a zanechávají rozsáhlé oblasti obnažené kůže. Nedostatek ochranné kožní bariéry pak může způsobit nadměrnou ztrátu tekutin, hypotermii nebo se mohou rozvinout sekundární infekce. Při adekvátní léčbě novorozenců a malých dětí se úmrtnost pohybuje pod 5 %. Rozvine-li se ovšem generalizovaný SSSS u dospělých se zdravotními problémy stoupá mortalita nad 50 % (Ladhani, 2003).

Yamasaki a kol. (2005b) zjistili, že protilátky proti ETs se tvoří imunizací proti serinovým proteázám. ETA vykazuje sekvenční homologii s proteázami v 32 %, ETB v 27 %, tím vysvětlili, proč se v krevním oběhu populace nachází více protilátek proti ETA než proti ETB. Snížený výskyt protilátek proti ETB v krevním séru pak může hrát roli

v patogenezi SSSS. Výskyt ETB totiž souvisí s generalizovanou formou SSSS, zatímco výskyt ETA je spojen s lokalizovanou formou SSSS. Jiným vysvětlením pro souvislost ETB s generalizovanou formou SSSS může být zvýšená virulence ETB (snadnější průchod epitelem) nebo jeho nadměrné uvolňování (mnohonásobné kopie plazmidu nesoucího gen *etb*) (Yamasaki a kol. 2005b).

3.2.3.3 Stafylokokové enterotoxiny

Kmeny *S. aureus* mohou produkovat extracelulární toxiny zvané pyrogenní superantigenní toxiny (PTSAgs, *pyrogenic toxin superantigenes*). K této skupině se řadí jak stafylokokové enterotoxiny (SEs), tak toxin-1 syndromu toxického šoku (TSST-1, *toxic-shock syndrome toxin-1*) (Dinges a kol., 2000). Jednou ze společných biologických vlastností všech PTSAgs je pyrogenní reakce (vyvolání zvýšené teploty). Horečka vzniká jako odpověď na endogenní pyrogeny, např. interleukiny, uvolněné z makrofágů (Bednář a kol., 1996; Vasconcelos a Cunha, 2010). K dalším charakteristikám patří schopnost zvýšit letalitu endotoxinu (lipopolysacharidů a lipidu A gramnegativních bakterií) u králíků až 100000krát (Bednář a kol., 1996; Dinges a kol., 2000). A konečně k nejvýznamnějším společným vlastnostem patří superantigenicita, která vede k nadměrné proliferaci T lymfocytů (Vasconcelos a Cunha, 2010).

SEs se na rozdíl od ostatních PTSAgs vyznačují silnými emetickými (vyvolávající zvracení) účinky a jsou považovány za hlavní příčinu otravy potravinami (Hu a kol., 2007; Vasconcelos a Cunha, 2010). Díky vlastnostem jako je rezistence k pepsinu a vysokým teplotám, jsou SEs schopny zůstat ve funkčním stavu při průchodu gastrointestinálním traktem a vyvolat tak onemocnění i při velmi malých dávkách SEs (Balaban a Rasooly, 2000). Otrava potravinami se vyznačuje krátkou inkubační dobou (1 až 4 hodiny) po požití kontaminované potraviny, po které se objevují nevolnost, zvracení, abdominální křeče a v některých případech průjem (Hu a kol., 2007; Vasconcelos a Cunha, 2010). SEs se ale také podílí na různých jiných onemocněních, jako je například syndrom toxického šoku nebo sekundární infekce u pacientů s atopickým ekzémem (Issartel a kol., 2005; Vasconcelos a Cunha, 2010).

V současnosti je popsáno 23 různých SEs, které zahrnují jak klasické enterotoxiny (SEA až SEI, SER, SES, SET), tak enterotoxinům podobné toxiny (SEI, *enterotoxin-like toxins*, SEII až SEIV), které ovšem nemají emetické účinky (Vasconcelos a Cunha, 2010).

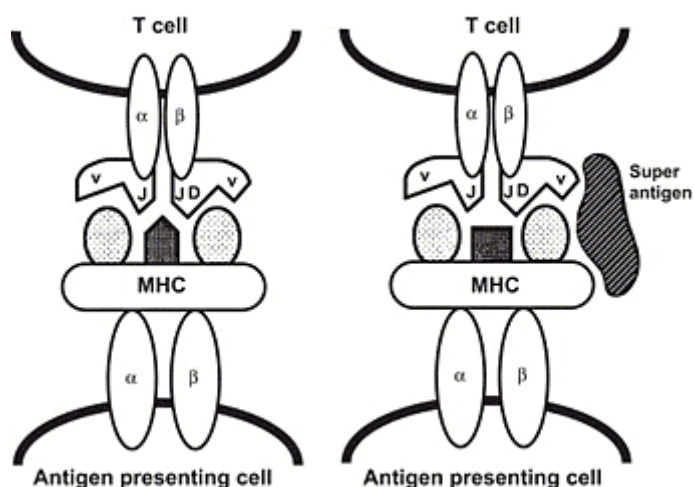
SEs jsou kódovány enterotoxinovými geny *ent*, lokalizovanými na plazmidech, bakteriofázích nebo ostrovech patogenity (mobilních genomových elementech podobných profágům) (Sergeev a kol., 2004; Gill a kol., 2005; Vasconcelos a Cunha, 2010). SEG, SEI, SEN, SEO, SEM jsou kódovány enterotoxinovým klastrem (skupinou) genů, jiné geny se vyskytují samostatně, např. *sea* (Sergeev a kol., 2004). Obecně jsou kmeny *S. aureus* často pozitivní (až 77 %) na přítomnost alespoň jednoho z genů SEs (Vasconcelos a Cunha, 2010). Ale tyto geny se nemusí vždy exprimovat, z 86 % se exprimuje *sec*, z 89 % *sed*, ze 49 % *seb*, ale naproti tomu gen *sea* se exprimuje ze 100 % (Sergeev a kol., 2004).

Z chemického hlediska se jedná o nízkomolekulární proteiny s molekulární hmotností 26,9 – 29,6 kDa. Podle krystalografických studií je trojrozměrná struktura všech SEs podobná. Také se zjistilo, že 15 % aminokyselinových zbytků je homologických u všech SEs a i jejich antigenní struktura je velmi podobná (Sergeev a kol., 2004; Vasconcelos a Cunha, 2010). Celkově molekuly SEs mají tvar elipsy a jsou složeny ze dvou domén. Sekundární struktura obou domén je kombinací α -helix a β -složených listů (Dinges a kol., 2000). Menší doména B obsahuje vazebné místo pro oligosacharidy a u klasických SEs také disulfidický můstek, spojení dvou cysteinů, který je pravděpodobně zapojený do emetických účinků toxinu. Větší doména A je nejspíše zapojená do superantigenní aktivity toxinů (Dinges a kol., 2000; Vasconcelos a Cunha, 2010). Přesto, že jsou tyto dvě funkčně odlišné charakteristické vlastnosti SEs lokalizovány na oddělených doménách, existuje mezi nimi silný vzájemný vztah. Ztráta superantigenní aktivity, například vlivem genetické mutace, vede i ke ztrátě emetických účinků (Vasconcelos a Cunha, 2010).

Jak již bylo uvedeno v kapitole Exfoliativní toxiny, superantigeny ovlivňují imunitní systém vazbou na hlavní histokompatibilní komplex třídy II na membráně antigen prezentující buňky (APC) se současnou vazbou na variabilní úsek V β řetězce receptoru T lymfocytu (TCR) (Vasconcelos a Cunha, 2010). Klasické antigeny, na rozdíl od superantigenů musí rozpoznat všech pět úseků (V β , D β , J β , V α , J α) receptoru TCR (viz **Obr. 1**), to vede ke specifické aktivaci jen asi 0,01 % T lymfocytů, což je základem specifické imunitní odpovědi. Superantigeny nespecificky aktivují až 20 % T lymfocytů a spouští tak nadměrné uvolňování cytokinů - od tumor nekrotizujícího faktoru (TNF), přes různé interleukiny až po interferon-gamma (Balaban a Rasooly, 2000; Vasconcelos a Cunha, 2010). Zvýšené uvolňování cytokinů způsobuje kapilární vazodilataci, která vede k hypotenzi, šoku, orgánovému selhání až k možné smrti (Vasconcelos a Cunha, 2010).

Obr. 1: Rozdíl v aktivaci T lymfocytu klasickým antigenem (vlevo) a superantigenem (vpravo).

(Zdroj: <http://www.sickkids.ca/research/yeunglab/custom/research.asp>)



Na rozdíl od dobře prozkoumaného působení SEs jako superantigenů, není příliš známo o mechanismech vzniku symptomů otravy potravinami, přes to, že jsou její běžnou příčinou (Balaban a Rasooly, 2000; Hu a kol., 2007). Hu a kol. (2007) zkoumali mechanismus, kterým SEA indukuje emesis (zvracení) na modelu rejseka pižmového (*Suncus murinus*). Podle této studie je klíčovým místem pro emetickou činnost tenké střevo, kde SEA výrazně zvyšuje uvolňování serotoninu (5-hydroxytryptaminu), který jako důležitý neurotransmitter přenáší vzruch prostřednictvím bloudivého nervu do centra pro zvracení v prodloužení míše. Dále z výzkumu vyplynulo, že aktivace kanabinoidního receptoru 1 (CB1) snižuje uvolňování serotoninu. K potlačení otravy se kromě inhibitorů syntézy serotoninu tedy používají také agonisté kanabinoidního receptoru 1 a antagonisté receptoru pro serotonin. Například granisetron, bránící vazbě přirozenému ligandu, serotoninu, který tak nemůže aktivovat dráhu vedoucí k indukci emesis. Tyto látky se používají k léčbě otrav potravinami nebo zvracení spojené s chemoterapií u pacientů s rakovinou (Hu a kol., 2007).

Exprese všech enterotoxinových genů (*ent*) není řízena regulačním systémem *agr* (viz kapitola Faktory virulence *Staphylococcus aureus*), protože se jedná o geny pohyblivé (Balaban a Rasooly, 2000; Vasconcelos a Cunha, 2010). *Agr* například neřídí produkci nejběžnějšího enterotoxinu zapojeného v otravě potravinami, toxinu SEA, který je kódován genem *entA* neseným temperovaným bakteriofágem. Naproti tomu, druhý nejčastější

enterotoxin způsobující otravy potravinami, SED, kódovaný genem *entD*, lokalizovaným na penicilinázovém plazmidu pIB485, je regulován *agr* (Balaban a Rasooly, 2000).

3.2.3.4 Toxin-1 syndromu toxického šoku

Jak již bylo zmíněno, mezi pyrogenní superantigenní toxiny (PTSAs) produkované kmeny *S. aureus* patří kromě enterotoxinů i toxin-1 syndromu toxického šoku. Sdílí všechny tři společné základní charakteristiky PTSAs, které byly popsány u enterotoxinů (pyrogenní reakce, schopnost zvyšovat letalitu endotoxinu a superantigenicita) (Dinges a kol., 2000). Protože má s enterotoxiny stejnou trojrozměrnou strukturu, byl k nim dříve zařazován a označován jako SEF, v důsledku malé homologie jejich genových sekvencí byl ale z této skupiny vyčleněn (Dinges a kol., 2000; Vasconcelos a Cunha, 2010).

TSST-1 je kódován genem *tst*, lokalizovaným uvnitř mobilního genetického elementu, stafylokokovém ostrovu patogenicity 1 na bakteriálním chromozomu. Z chemického hlediska se jedná o protein složený ze dvou domén o molekulární hmotnosti 22 kDa (Dinges a kol., 2000).

Na rozdíl od enterotoxinů TSST-1 neobsahuje ve své molekule žádné cysteinové zbytky, nemá tedy emetické účinky a není příčinou otravy potravinami (Dinges a kol., 2000; Vasconcelos a Cunha, 2010). Způsobuje poměrně vzácné, nicméně potenciálně život ohrožující onemocnění zvané syndrom toxického šoku (TSS, *toxic shock syndrome*) (McNamara a kol., 2009). Jedná se o systematické onemocnění, charakterizované vysokou horečkou, hypotenzí, kožními příznaky (vyrážka doprovázená odlupováním kůže na dlaních a ploskách nohou) a multiorgánovým selháním (Parsonnet a kol., 2005). Za klinickou manifestaci TSS zodpovídají cytokiny nadměrně uvolňované leukocyty v důsledku superantigenicity TSST-1 a některých stafylokokových enterotoxinů (SEB, SEC a v menší míře SEA, SED), které se také podílejí na patogenezi TSS (Descloux a kol., 2008).

První a nejdůležitější vlastností, která se podílí na vzniku TSS, je superantigenicita. (Dinges a kol., 2000). Tato vlastnost byla již popsána v kapitolách Exfoliativní toxiny a Stafylokokové enterotoxiny. TSST-1 indukuje polyklonální imunitní odpověď tím, že se přímo váže na hlavní histokompatibilní komplex třídy II a současně na receptory T lymfocytů, bez předchozího zpracování antigen prezentující buňkou (makrofágem,

B lymfocytem) (Pajerek a kol., 2006, Vasconcelos a Cunha, 2010). Další faktor podílející se na vzniku TSS způsobuje hypotenzi jako nejzávažnější příznak. Jedná se o zvýšení citlivosti k hostitelskému endotoxinu, což vede ke kapilární dilataci, zprostředkované tumor nekrotizujícím faktorem (TNF- α) (Dinges a kol., 2000). TSST-1 se dále prostřednictvím receptorů váže na endotelové buňky kapilár, způsobuje jejich smrt a tím zvyšuje propustnost kapilár (Dinges a kol., 2000; Peterson a kol., 2005).

Podle způsobu vzniku se rozlišují se dvě formy TSS, které se však zásadně klinicky neliší. Menstruální forma je spojená s používáním menstruačních tampónů. Druhá forma, tzv. nemenstruální je pozorovaná při infekcích chirurgických ran, popáleninách, infekci kůže, podkoží či závažných infekcích vnitřních orgánů jako je např. pneumonie (Pajerek a kol., 2006).

Téměř všechny (99 %) případy menstruálního TSS jsou spojeny s používáním vysoce absorpčních menstruačních tampónů (Vasconcelos a Cunha, 2010). Tento fakt je vysvětlován tím, že se dostane se zaváděným tampónem do anaerobní pochvy kyslík, který je nezbytný pro produkci TSST-1 toxigenním kmenem *S. aureus* (Dinges a kol., 2000). Používání menstruačních tampónů však v žádném případě není jediným faktorem, který je odpovědný za rozvoj menstruálního TSS. K tomu, aby došlo k vývoji menstruálního TSS musí být pochva kolonizovaná toxigenním kmenem *S. aureus* produkujícím TSST-1 (popřípadě některý z SEs). Parsonnet a kol. (2005) zjistili, že asi 9 % studované populace žen má pochvu kolonizovanou *S. aureus* a z toho pouze jedno procento toxigenním kmenem. Druhým z nezbytných faktorů pro rozvoj menstruálního TSS je průnik dostatečné koncentrace TSST-1 přes epitel. Podle Peterson a kol. (2005) TSST-1 a příslušný kmen *S. aureus* interagují s receptory na epitelových buňkách lidské pochvy. V důsledku toho dojde k syntéze chemokinů a cytokinů, které vyvolají zánětlivou odpověď a umožní průnik TSST-1 přes poševní sliznici. Při vzniku menstruálního TSS hraje také roli množství protilátek proti TSST-1. Žena, která nemá vytvořené protilátky nebo jen v nedostatečném množství, je tímto syndromem daleko více ohrožena. Podle Parsonnet a kol. (2005) má většina žen v obecné populaci (85 %) vytvořeny protilátky proti TSST-1. Tyto protilátky jsou již vytvořeny i u většiny (81 %) dospívajících (13 až 18 let), z čehož vyplývá, že mladé dívky nemají významně vyšší riziko rozvoje menstruálního TSS než starší ženy, jak se dříve myslelo (Parsonnet a kol., 2005). V současné době počet případů menstruálního TSS klesá díky preventivním opatřením. Na povrch menstruačních tampónů se například přidávají různé chemické látky, povrchově aktivní látky, aromatické sloučeniny,

isoprenoidy a podobně, které zasahují do růstu *S. aureus* a do produkce a aktivity TSST-1 (McNamara a kol., 2009).

Na rozdíl od menstruačního TSS, pacienti s nemenstruační formou TSS tvoří heterogenní skupinu s širokým věkovým rozmezím, rozmanitým doprovodným onemocněním a různým místem a typem infekce *S. aureus*. V polovině případů nemenstruačního TSS je *S. aureus* přítomen v krevním řečišti (bakteriémie) pacienta, další komplikací bývá častější výskyt neurologických poruch. Jsou to pravděpodobné dva důvody vyšší úmrtnosti u této formy TSS (22% mortalita) ve srovnání s menstruační formou TSS (0% mortalita), u které bakteriémie nebyla prokázána a neurologické poruchy jsou méně častou komplikací. To je dáváno do souvislosti s rozdílnými toxiny, které jsou zapojené v rozvoji určité formy TSS. Nemenstruační TSS způsobují častěji enterotoxiny (SEB, SEC, SED), které jsou více neurotoxické než TSST-1 a SEA, typické pro menstruační TSS (Descloux a kol., 2008).

3.3 Metody detekce extracelulárních toxinů *Staphylococcus aureus*

Metody detekce extracelulárních toxinů *S. aureus* lze rozdělit na tradiční imunologické metody, založené na detekci pomocí protilátek a moderní molekulárně biologické metody, založené na detekci genů kódujících toxiny. Ve srovnání s molekulárně biologickými metodami jsou imunologické málo citlivé a časově náročnější. Na druhou stranu detekcí genů nezjistíme, jestli je příslušný toxin kmenem skutečně produkován (Vasconcelos a Cunha, 2010).

3.3.1 Imunologické metody detekce

Vysoce specifická vazba protilátek k antigenům umožnila široké rozšíření různých imunologických metod pro detekci extracelulárních toxinů. Mezi nejčastěji používané patří ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) a reverzní pasivní latexová aglutinace (RPLA, *reverse passive latex agglutination*) (Di Pinto a kol., 2004). RPLA je modifikací latexové aglutinace, jejíž základní princip spočívá v potažení latexové kuličky specifickými protilátkami proti detekovatelnému antigenu (v tomto případě toxinu). Je-li toxin ve vzorku obsažen, protilátka aglutinuje a klesá na dno reakční jamky, kde utváří charakteristickou sraženinu (Di Pinto a kol., 2004; Paulík, 2005).

Na principu latexové aglutinace bývá založen průkaz TSST-1 a PVL (Pajerek a kol., 2006; Oishi a kol., 2008). Oishi a kol. (2008) vyvinuli RPLA k rychlé detekci kmenů produkujících PVL, která je vysoce specifická a citlivá k detekci tohoto toxinu.

Di Pinto a kol. (2004) detekovali pomocí RPLA stafylokokové enterotoxiny ve vzorcích potravin. Podle jejich experimentů je metoda vhodným nástrojem pro rutinní monitorování přítomnosti malých koncentrací stafylokokových enterotoxinů, schopných vyvolat intoxikaci (otravu potravinami), v různých vzorcích potravin. Stejných výsledků dosáhli také metodou Western blotu, která spočívá v elektroforetickém rozdělení (viz Molekulárně biologické metody detekce) vzorku, přenosu na nitrocelulózovou membránu a detekci toxinů pomocí specifických protilátek.

Do kategorie detekcí pomocí imunoreakce se značenými protilátkami patří techniky ELISA a radioimunoanalýza (Paulík, 2005). Princip ELISA je založen na enzymatickém (většinou křenová peroxidáza nebo alkalická fosfatáza) značení protilátky a detekce

přítomnosti antigenu závisí na přeměně chromogenního substrátu tímto enzymem. Existují dvě formy této techniky. Při kompetitivní ELISA značený antigen soutěží s neznačeným antigenem ve vzorku o vazbu na protilátku imobilizovanou na mikrotitrační destičku. Častěji používanou variantou je sendvičová ELISA. Do mikrotitrační destičky, na jejímž povrchu je navázaná specifická protilátka, se přidá vzorek s neznámým obsahem antigenu a po inkubaci a vymytí nenavázaného antigenu se přidá sekundární enzymaticky značená protilátka. Po další inkubaci a vymývání se přidá specifický substrát, 3,3',5,5'-tetramethylbenzidin nebo p-nitrofenyl fosfát, který je štěpen enzymem za vzniku zbarvení kvantifikovaného fotometricky pomocí ELISA readeru (Pingoud a kol., 2002). Mezi nejcitlivější metody pro detekci nízkomolekulárních antigenů patří také radioimunoanalýza, založená na stejném principu jako ELISA, protilátka ale není značena enzymem nýbrž radioaktivním prvkem (Pingoud a kol., 2002; Paulík, 2005).

Mezi další metody, které se používají pro detekci extracelulárních toxinů, patří například imunodifuze. Princip imunodifúzních technik je založen na tvorbě komplexu antigen-protilátka, tzv. imunoprecipitátu v prostředí agarózového gelu, kde po difúzi vznikají precipitační linie (Pingoud a kol., 2002; Paulík, 2005). Rozlišujeme radiální imunodifuzi, při níž je specifická protilátka rovnoměrně rozptýlena v gelu a neznámý vzorek s antigenem se pipetuje do jamek v gelu. Výsledkem je prstencový precipitát, který je porovnáván s kalibrátorem (známou koncentrací antigenu) (Paulík, 2005). Jinou formou je dvojitá imunodifuze, v tomto případě gel slouží pouze jako prostředí pro difuzi. Protilátky a antigeny jsou pipetovány zvlášť do jamek v gelu a precipitační linie se tvoří v oblasti, kde se navzájem střetávají se stejnou koncentrací (Pingoud a kol., 2002).

Kawabata a kol. (1997) porovnávali různé metody detekce exfoliativních toxinů z klinických izolátů *S. aureus*. Prokázali vysokou citlivost (detekční limit 1 ng/ml) a specifitu metody RPLA. Například imunodifúzní metoda byla méně citlivá (50 ng/ml až 60 ng/ml). Naopak metoda ELISA byla sice citlivější než RPLA, ale méně specifická, vykazovala křížové reakce mezi ETA a ETB protilátkami a antigeny. Kawabata a kol. (1997) tedy doporučili RPLA pro rychlé diagnostikování stafylokokového syndromu opárené kůže (SSSS) v rámci kontroly šíření tohoto syndromu zejména v porodnicích.

3.3.2 Molekulárně biologické metody detekce

V současnosti hojně používané a spolehlivé metody detekce genů kódujících extracelulární toxiny jsou molekulárně biologické metody založené na principu polymerázové řetězové reakce (PCR, *polymerase chain reaction*) (Vasconcelos a Cunha, 2010).

PCR je obecně technika založená na amplifikaci požadované specifické sekvence DNA pracující na principu replikace pomocí enzymu DNA-polymerázy. K jejímu použití je zapotřebí znát pouze dvě krátké nukleotidové sekvence ohraničující zkoumanou sekvenci, tzv. primery, které se vážou na protilehlé řetězce DNA. Při PCR se cyklicky opakují tři kroky v závislosti na teplotě reakční směsi. V prvním kroku je DNA obsahující zkoumanou sekvenci denaturována při 94°C. V druhém kroku jsou k denaturované DNA připojeny primery při teplotě 30°C až 50°C. A ve třetím kroku probíhá syntéza nových řetězců DNA (při teplotě 65°C až 75°C). Denaturovaná DNA slouží jako templát pro přidávání nukleotidů ke komplementárním úsekům mezi primery pomocí enzymu DNA-polymerázy, většinou termostabilní *Taq* DNA-polymerázy izolované z *Thermus aquaticus*. Tyto tři kroky se mnohokrát opakují. Výsledným produktem PCR jsou tedy amplikony, mnohonásobně zmnožené zkoumané sekvence DNA, v tomto případě geny kódující extracelulární toxiny.

Přítomnost amplikonů se v reakční směsi nejčastěji prokazuje gelovou elektroforézou s následnou vizualizací pomocí vhodného barviva. Principem této nejpoužívanější separační techniky v molekulární biologii je rozdělení nabitých molekul v elektrickém poli. Elektroforetické gely působí jako molekulární síta zpomalující průchod velkých molekul při průchodu elektrického proudu. Nejčastěji se používají dva typy těchto gelů, agarózový a polyakrylamidový. Nukleové kyseliny mají díky negativně nabitým fosfátovým skupinám rovnoměrně rozložený záporný náboj. V gelu se tedy při průchodu elektrického proudu pohybují od katody k anodě a dělí výhradně podle velikosti, na rozdíl od proteinů, u kterých při rozdělování hraje roli i velikost náboje (Šmarda a kol., 2005; Snustad a Simmons, 2009). Po dokončení elektroforézy je třeba separované molekuly nukleových kyselin zviditelnit, většinou pomocí fluorescenčních barviv nebo dusičnanu stříbrného (při separaci v polyakrylamidových gelech). Nejpoužívanějším barvivem pro detekci molekul DNA je ethidium bromid, který vytváří komplex s DNA vmezeřováním

mezi sousední páry bazí a po ozáření ultrafialovým světlem červeně fluoreskuje (Šmarda a kol., 2005).

Méně často se přítomnost specifických amplikonů prokazuje také jinými technikami. Například při detekci genů kódujících enterotoxin A a B Gilliganem a kol. (2000) byla místo elektroforézy použita metoda ELISA detekující sondu hybridizovanou s komplementární částí amplifikovaného úseku (Šmarda a kol., 2005). U této PCR-ELISA byl zjištěný detekční limit o jeden řád nižší v porovnání s jednoduchou PCR s následnou elektroforézou v agarózovém gelu (Gilligan a kol., 2000).

Přestože PCR je velmi citlivou metodou pro detekci genů kódujících extracelulární toxiny, je schopná pouze určit přítomnost či nepřítomnost genů. Není už však schopna určit, zda se daný gen v buňce exprimuje. Za tímto účelem byla vyvinuta reverzně-transkriptázová PCR (RT-PCR, *Reverse Transcriptase PCR*), jako jedna z variant PCR. Je založena na detekci sekvence mRNA zodpovědné za produkci toxinů, čímž dokazuje aktivitu genů (Špišek, 2005; Vasconcelos a Cunha, 2010). RNA ale nemůže sloužit jako templát pro PCR. Musí být proto nejprve převedena do cDNA retrovirovou reverzní transkriptázou (odtud název techniky), která je následně standardním postupem PCR amplifikována (Šmarda a kol., 2005; Špišek, 2005). RT-PCR byla využita například v experimentech Hu a kol. (2007) pro měření exprese genu kódujícího stafylokokový enterotoxin A ve tkáních rejseka pižmového.

Od zavedení obecné techniky PCR bylo vyvinuto mnoho jejích různých variant. Kromě již zmíněné RT-PCR byla popsána například mnohonásobná PCR (*multiplex PCR*). Jedná se o polymerázovou řetězovou reakci s více páry primerů rozpoznávající několik rozdílných cílových sekvencí v reakční směsi. To obecně umožňuje detekci několika genů zároveň, včetně amplifikace vnitřních kontrol současně se vzorky (Šmarda a kol., 2005). Hlavní výhody mnohonásobné PCR tedy spočívají v nižších nákladech a zkrácení času potřebného pro detekci několika genů (Mehrotra a kol., 2000). Například Mehrotra a kol. (2000) detekovali pomocí této metody geny kódující stafylokokové enterotoxiny A až E (*entA*, *entB*, *entC*, *entD*, *entE*), toxin-1 syndromu toxického šoku (*tst*), exfoliativní toxiny A a B (*etaA* a *etaB*) a gen pro rezistenci vůči methicilinu (*mecA*). Jako pozitivní vnitřní kontrolu použili detekci genu *femA* nezbytného pro expresi rezistence vůči methicilinu, který byl přítomen v každém ze zkoumaných lidských izolátů *S. aureus* (Mehrotra a kol., 2000; Al-Talib a kol., 2009). K amplifikaci těchto deseti stafylokokových genů byly navrženy dva soubory primerů. Jejich specifita a spolehlivost byla ověřena porovnáním

s jednoduchou PCR, kdy se přítomnost genů prokazovala jednotlivě (Mehrotra a kol., 2000).

Další variantou polymerázové řetězové reakce je PCR v reálném čase (*real-time* PCR), která je založena na možnosti monitorovat postup PCR v reálném čase (Šmarda a kol., 2005). Existují různé způsoby detekce vzniku amplikonů v průběhu PCR reakce. Od interkalačních fluorescenčních barviv vázajících se přímo na dvouřetězcový produkt PCR (např. barvivo SYBR Green) přes fluorescenčně značené sondy vázající se na amplifikovaný produkt až po fluorescenčně značené primery nasedající na denaturovanou DNA při syntéze nového produktu (Šmarda a kol., 2005). Například Letertre a kol. (2003) použili pro detekci produktů PCR v reálném čase fluorescenční barvivo SYBR Green. Cílem experimentů Letertre a kol. (2003) bylo vyvinout PCR v reálném čase s univerzálním souborem primerů pro rychlý screening genů devíti enterotoxinů *S. aureus* současně. K tomu použili jeden univerzální forward primer SA-U a specifické reversní primery pro sledované geny. Spolehlivost metodiky byla ověřena jednoduchou PCR detekcí a reverzní pasivní latexovou aglutinací (RPLA), podle které odpovídala produkce toxinů detekovaným genům. Jednou z výhod PCR v reálném čase je poskytování výsledků okamžitě po dokončení amplifikační reakce bez potřeby dalšího zpracování vzorků a bez otevření reakčních zkumavek, což výrazně snižuje riziko kontaminace během manipulace se vzorky (Letertre a kol., 2003). Další její výhodou je možnost kvantifikovat výsledek PCR (Špišek, 2005).

K jiným metodám, které slouží k detekci více genů zároveň, patří kombinace PCR s DNA mikročipy (*PCR-microarray assay*) (Sergeev a kol., 2004). Podstatou mikročipů je navázání oligonukleotidů DNA (sond) na skleněnou nosnou destičku, na kterou se následně přidá vzorek. V případě navázání detekované sekvence na oligonukleotid (hybridizace) pak vznikne fluorescenční signál (Špišek, 2005). Například Sergeev a kol. (2004) popsali *PCR-microarray assay* pro současnou detekci více enterotoxinových genů (*ent*). Vzorky analyzovali za použití souboru degenerovaných primerů pro detekci variabilních úseků enterotoxinových genů pomocí PCR amplifikace. Zmnožené variabilní úseky byly posléze identifikovány pomocí mikročipu. Přesnost této kombinované metody byla podpořena srovnáním s jednoduchou PCR s následnou elektroforézou a sekvencováním enterotoxinových genů (Sergeev a kol., 2004).

Pro detekci extracelulárních toxinů se také v některých případech používají metody hybridizace DNA-DNA, založené na vytváření dvouřetězcových molekul z jednořetězců DNA za předpokladu, že jsou jejich sekvence vzájemně úplně nebo částečně

komplementární (Šmarda a kol., 2005). Například Ewald a kol. (1990) použili jednu z variant hybridizace - hybridizaci kolonií pro detekci stafylokokových enterotoxinů, u níž prokázali 100% spolehlivost ve srovnání s imunologickými metodami (ELISA, RPLA, imunodifúze apod.). Hybridizace kolonií patří do skupiny hybridizací na pevném podkladu, nukleové kyseliny bezprostředně uvolněné z bakteriálních kolonií jsou přenášeny na membránu, na které probíhá vlastní hybridizace (Šmarda a kol., 2005).

4 MATERIÁL A METODY

4.1 Biologický materiál

Studované izoláty *S. aureus* byly sbírány ve Fakultní nemocnici Olomouc v letech 2009 až 2011 od pacientů se závažnými až život ohrožujícími klinickými stavy.

Nejčastějším klinickým materiálem, ze kterého byly izoláty získány, byla krev (35 %), stěr z rány (33 %) a materiál z dolních cest dýchacích (endosekret, sputum, bronchoalveolární laváž = BAL) (18 %), dalšími klinickými materiály byly výtěry z krku (5 %), stěr z kůže (3 %) a hnis (2 %). Po jednom byly izoláty získány z punktátu z rány, moči, výtěru z ucha a výtěru z krku a nosu (celkově 4 %). Průměrný věk pacientů, od kterých klinický materiál pocházel, byl 50 let (věkové rozmezí 0-88 let). Diagnózy pacientů byly různorodé (malignitidy, abscesy, fraktury, dermatitidy, sepse a další).

Identifikace izolátů byla provedena klasickými mikrobiologickými postupy pomocí komerčně dostupných testů STAPHYtest16 (Pliva-Lachema) a Phoenix PMIC/ID-67 (BD, USA). U 6 izolátů byl prokázán methicilin-rezistentní *Staphylococcus aureus* (MRSA), u ostatních methicilin-senzitivní *Staphylococcus aureus* (MSSA). Úplný přehled všech (97) studovaných izolátů *S. aureus* je uveden v **Tab. 1**.

Tab. 1: Přehled studovaných izolátů *S. aureus*.

Izolát <i>S. aureus</i>	Rok izolace	Klinický materiál	Izolát <i>S. aureus</i>	Rok izolace	Klinický materiál
17	2009	Krev	10	2010	Stěr z kůže
18	2009	Krev	13	2010	Výtěr z krku
19	2009	Krev	12	2010	Výtěr z krku
11	2009	Krev	78	2010	Hnis
16	2009	Krev	79	2010	Stěr z rány
12	2009	Krev	80	2010	Stěr z rány
22104/A	2009	Stěr z rány	81	2010	Endosekret
2	2010	Krev	82	2010	Punktát z rány
1	2010	Krev	83	2010	Stěr z rány
20	2010	Stěr z rány	84	2010	Stěr z rány
19	2010	Stěr z rány	86	2010	Stěr z rány
17	2010	Endosekret	87	2010	Stěr z rány
18	2010	Endosekret	88	2010	Stěr z rány
11*	2010	Sputum	90*	2010	Stěr z rány
104	2010	Endosekret	126	2010	Krev
8	2010	Endosekret	103	2010	Endosekret
9	2010	Výtěr z krku	89	2010	Stěr z rány
21	2010	Stěr z kůže	85	2010	Výtěr z krku a nosu
16	2010	Výtěr z ucha	102	2010	Stěr z rány
15	2010	Výtěr z krku	100	2010	Stěr z rány
14	2010	Výtěr z krku	91*	2010	Stěr z rány
105	2010	Endosekret	127	2010	Krev
106	2010	Endosekret	128	2010	Krev
107*	2010	Moč	129	2010	Krev
108	2010	Krev	101*	2010	Stěr z rány
109	2010	Krev	23	2011	Stěr z rány
110	2010	Krev	24	2011	Stěr z rány
111	2010	Krev	25	2011	Stěr z rány
112	2010	Krev	26	2011	Stěr z rány
113	2010	Krev	27	2011	Stěr z rány
92	2010	Stěr z rány	28	2011	Stěr z rány
93	2010	Sputum	29	2011	Hnis
94	2010	Stěr z rány	30	2011	Stěr z rány
95	2010	Endosekret	32	2011	Stěr z rány

Legenda: * = MRSA (methicilin-rezistentní *Staphylococcus aureus*).

Tab. 1: Přehled studovaných izolátů *S. aureus* (pokračování).

Izolát <i>S. aureus</i>	Rok izolace	Klinický materiál	Izolát <i>S. aureus</i>	Rok izolace	Klinický materiál
96	2010	Sputum	33	2011	Stěr z rány
97	2010	Stěr z rány	34	2011	Endosekret
98	2010	BAL	35	2011	Stěr z rány
115	2010	Krev	37	2011	Stěr z rány
118	2010	Krev	38	2011	Krev
120	2010	Krev	39	2011	BAL
3	2010	Krev	40	2011	Krev
4	2010	Krev	41	2011	Stěr z rány
5	2010	Krev	48	2011	Stěr z kůže
6	2010	Krev	49	2011	Sputum
99	2010	Stěr z rány	7	2011	Endosekret
121	2010	Krev	22	2011	Krev
122	2010	Krev	1*	2011	Krev
123	2010	Krev	2	2011	Krev
124	2010	Krev			

Legenda: * = MRSA (methicilin-rezistentní *Staphylococcus aureus*).

4.2 Kultivace *S. aureus* a izolace DNA

1. Izoláty *S. aureus* byly kultivovány na krevním agaru (Trios) přes noc při teplotě 37°C za aerobních podmínek.
2. Z vypěstované kultury *S. aureus* bylo sterilní kličkou odebráno 2 až 5 kolonií, které byly následně rozsuspendovány ve 100 µl redestilované vody.
3. Suspenze byla inkubována v termomixeru 15 min při teplotě 99°C za mírného třepání.
4. Zlyzované bakteriální buňky byly centrifugovány 2 min při 1006 g.
5. Po centrifugaci bylo 90 µl supernatantu s uvolněnou bakteriální DNA přepipetováno do nové mikrozkušavky, zamraženo při -20°C a takto uchováno pro amplifikaci.

4.3 Detekce genů pomocí jednoduché PCR

Izolovaná DNA všech studovaných izolátů *S. aureus* byla testována na přítomnost genů – *pvl* (současná detekce genů *lukS-PV* a *lukF-PV*), *tst*, *eta* a *etb* kódujících extracelulární toxiny - PVL, TSST-1, ETA a ETB pomocí PCR amplifikace s příslušnými primery.

4.3.1 PCR amplifikace DNA

Reakční směs pro PCR reakci byla připravena napipetováním položek do 1,5ml mikrozkušavky podle **Tab. 2** ve sterilním laminárním boxu za použití sterilních pomůcek. Sekvence použitých primerů jsou uvedeny v **Tab. 3**.

Po napipetování všech položek byla směs krátce zvortexována a centrifugována na stolní minicentrifuze. Takto připravená reakční směs byla rozpipetována do čistých 0,5ml mikrozkušavek po 49 μ l a do každé byl přidán 1 μ l roztoku izolované DNA jednotlivých izolátů *S. aureus*. Vzniklé směsi byly převrstveny 45 μ l PCR oleje. Mikrozkušavky byly poté vloženy do termocykleru, průběh PCR reakce je uveden v **Tab. 4**.

Jako pozitivní kontrola byla použita DNA izolovaná z kmenů *S. aureus* nesoucí detekované geny získané od RNDr. Petra Petráše, CSc. z Národní referenční laboratoře pro stafylokoky Státního zdravotního ústavu České republiky v Praze (kmeny nesoucí geny *tst* a *pvl*) a z České sbírky mikroorganismů (kmen CCM 7058 nesoucí geny *eta* a *etb*). Negativní kontrola byla použita jen pro opakování PCR u izolátů pozitivních na výskyt genu kódujícího toxin. U ostatních izolátů byla PCR reakce negativní, tudíž nekontaminovaná.

Tab. 2: Složení PCR směsi pro jednu reakci (49 µl).

Položka reakční směsi	Pipetovaný objem [µl]
H ₂ O pro PCR	42,2
PCR pufr s MgCl ₂ 10x	5
Roztok dNTPs (40 mmol/l)	0,4
Primer F (100 µmol/l)	0,5
Primer R (100 µmol/l)	0,5
Taq DNA polymeráza (5 U/µl)	0,4

Tab. 3: Sekvence primerů použitých pro detekci genů *pvl*, *tst*, *eta* a *etb*.

Název primeru	Sekvence primeru (5' → 3')	Velikost amplikonu [bp]	Literární zdroj
<i>pvl</i> F <i>pvl</i> R	ATCATTAGGTAAAATGTCTGGACATGATCC GCATCAASTGTATTGGATAGCAAAAAGC	433	Lina a kol., 1999
<i>tst</i> F <i>tst</i> R	GCTTGCGACAACCTGCTACAG TGGATCCGTCATTCATTGTTAT	559	Monday a Bohach, 1999
<i>eta</i> F <i>eta</i> R	GCAGGTGTTGATTTAGCATT AGATGTCCCTATTTTTGCTG	93	Lee a kol., 1987
<i>etb</i> F <i>etb</i> R	ACAAGCAAAAAGAATACAGCG GTTTTTGGCTGCTTCTCTTG	226	Jackson a landolo, 1986

Tab. 4: Průběh PCR reakce.

Proces	Teplota [°C]	Čas [min]	Počet cyklů
Počáteční denaturace DNA	94	5	1
Denaturace DNA	94	1	30
Připojení primerů	56	1	
Prodlužování komplementárního vlákna	72	1	
Závěrečné prodloužení	72	10	1

4.3.2 Elektroforéza a vizualizace výsledků

1,7% agarózový gel pro elektroforézu byl připraven smícháním 1,2 g agarózy a 70 ml pufru TBE 1x (získán naředěním zásobního pufru TBE 10x) a následným rozvařením v mikrovlnné troubě. Rozvařený gel byl 15 min ochlazován pomocí laboratorní míchačky, před koncem míchání byly přidány 4 μ l ethidium bromidu. Poté byl gel nalit do elektroforetické vany a po ztuhnutí (asi 45 min) převrstven pufrem TBE 1x.

Do první jamky agarózového gelu bylo nanášeno 6 μ l DNA markeru smíšeného s nanášecím pufrem (3 μ l DNA markeru + 3 μ l nanášecího pufru). Do následujících jamek bylo nanášeno po 15 μ l PCR produktů (včetně pozitivní kontroly) taktéž smíšených s nanášecím pufrem (15 μ l PCR produktu + 3 μ l nanášecího pufru, po smísení do gelu nanášeno pouze 15 μ l roztoku).

Elektroforéza probíhala 45 minut při elektrickém napětí 80 V a proudu 20 mA. Po ukončení separace PCR produktů byl gel vystaven UV záření o vlnové délce 254 nm pro vizualizaci výsledků (ethidium bromid interkalovaný do produktů PCR po ozáření UV světlem fluoreskuje) a zdokumentován programem Scion Image.

4.4 Seznam použitých chemikálií a roztoků

- 10× koncentrovaný pufr pro PCR s MgCl_2 (Top-Bio)
- 10× koncentrovaný TBE pufr (Bio-Rad)
- Agaróza (SERVA)
- Deoxyribonukleotid trifosfáty, dNTPs (40 mmol/l; Promega)
- DNA marker 200-1500 coloured (Top-Bio)
- Ethidium bromid (1 $\mu\text{g/ml}$; Sigma-Aldrich)
- Nanášecí pufr (Top-Bio)
- PCR olej (Top-Bio)
- PCR voda (Top-Bio)
- *Taq* DNA polymeráza Unis (5 U/ μl ; Top-Bio)

4.5 Seznam použitých laboratorních přístrojů

- Centrifuga Rotina 35R (Hettich)
- Dokumentační zařízení Scion Image (Scion Corporation)
- Elektroforetická komora Minigel 2 (Apelex)
- Laboratorní míchačka Hotplate & Stirrer 1103 (Jenway)
- Laminární box Steril VBH Compact (Steril)
- Lednice (Whirlpool)
- Mikrovlnná trouba (Moulinex)
- MiniCycler TM PTC-150 (MJ Research)
- Minishaker MS1 (IKA)
- Stolní váha 440 – 47 (KERN)
- Thermomixer comfort (Eppendorf)
- UV transiluminátor Discovery model (Ultra-Lum)
- Zdroj stejnosměrného proudu pro elektroforézu PowerPac Power Supply (Bio-Rad)

5 VÝSLEDKY

5.1 Izolace DNA z izolátů *S. aureus*

V této práci bylo na přítomnost genů, kódujících extracelulární faktory virulence (TSST-1, ETA, ETB, PVL), testováno 97 izolátů *S. aureus* získaných od pacientů z Fakultní nemocnice Olomouc v letech 2009 až 2011. Bakteriální DNA byla izolovaná z kolonií izolátů *S. aureus* jednoduchou a rychlou metodou extrakce pomocí vysoké teploty (99°C), jejíž vhodnost pro testování přítomnosti genů kódujících extracelulární toxiny byla ověřena v předcházející studii Sauer a kol. (2008).

5.2 Detekce genů *pvl*, *tst*, *eta*, *etb* pomocí jednoduché PCR

Po izolaci bakteriální DNA byly všechny vzorky testovány na přítomnost genů *pvl*, *tst*, *eta* a *etb* pomocí jednoduché PCR. Všechny použité primery produkovaly amplikony o definované předpokládané velikosti, tzn. 433 bp, 559 bp, 93 bp a 226 bp. Pro detekci produktů PCR byla použita jejich separace elektroforézou v agarózovém gelu a vizualizace pomocí ethidium bromidu.

5.2.1 Zjištěný výskyt genů *pvl*, *tst*, *eta*, *etb* u studovaných izolátů

Na přítomnost genů kódujících extracelulární toxiny (*pvl*, *tst*, *eta*, *etb*) bylo studováno celkem 97 izolátů *S. aureus*.

Geny *pvl* (amplikon o velikosti 433 bp) byly pomocí PCR detekovány u dvou izolátů *S. aureus*: 100/10 a 97/10. Z celkového počtu 97 testovaných izolátů byly tedy na geny *pvl* pozitivní 2,1 % izolátů. Pozitivní detekci genů *pvl* u izolátu 97/10 dokládá elektroforetogram na **Obr. 2**.

Gen *tst* (amplikon o velikosti 559 bp) byl pomocí PCR detekován u pěti izolátů *S. aureus*: 17/09, 79/10, 84/10, 102/10, 128/10. Z celkového počtu 97 testovaných izolátů bylo tedy na gen *tst* pozitivních 5,2 % izolátů. Pozitivní detekci genu *tst* u izolátu 102/10 dokládá elektroforetogram na **Obr. 3**.

Gen *eta* (amplikon o velikosti 93 bp) byl pomocí PCR detekován u třech izolátů *S. aureus*: 105/10, 118/10, 124/10. Z celkového počtu 97 testovaných izolátů byly tedy na

gen *eta* pozitivní 3,1 % izolátů. Pozitivní detekci genu *eta* u izolátu 118/10 dokládá elektroforetogram na **Obr. 4**.

Gen *etb* (amplikon o velikosti 226 bp) nebyl pomocí PCR amplifikován u žádného z testovaných izolátů. Z celkového počtu 97 testovaných izolátů bylo tedy na gen *etb* pozitivních 0,0 % izolátů.

Souhrnný přehled zachycených výskytů detekovaných genů mezi studovanými izoláty je uveden v **Tab. 5**.

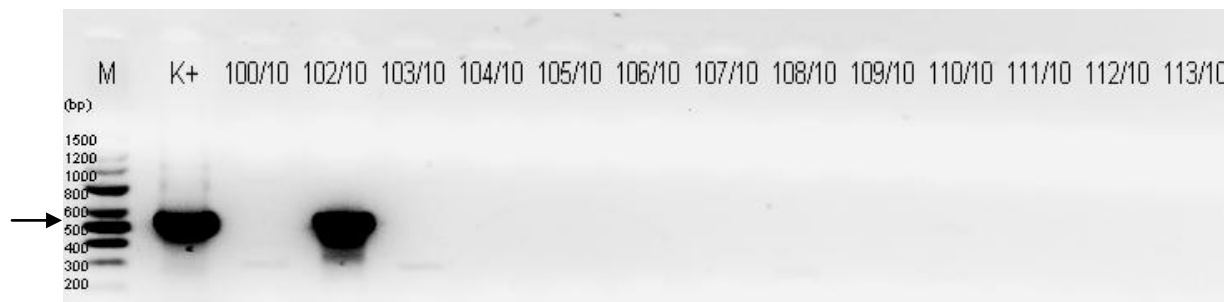
Z 97 testovaných izolátů *S. aureus* bylo 10 (10,3 %) pozitivních na přítomnost genů kódujících jeden z toxinů - PVL, TSST-1 nebo ETA. 87 izolátů (89,7 %), zahrnujících i 6 izolátů methicilin-rezistentních *Staphylococcus aureus* (MRSA), neneslo žádný z detekovaných genů. A u žádného z testovaných izolátů nebyla zjištěna přítomnost více těchto genů současně.

Obr. 2: Elektroforetogram zobrazující detekci genů *pvl* pomocí PCR u izolátu 97/10 *S. aureus*.



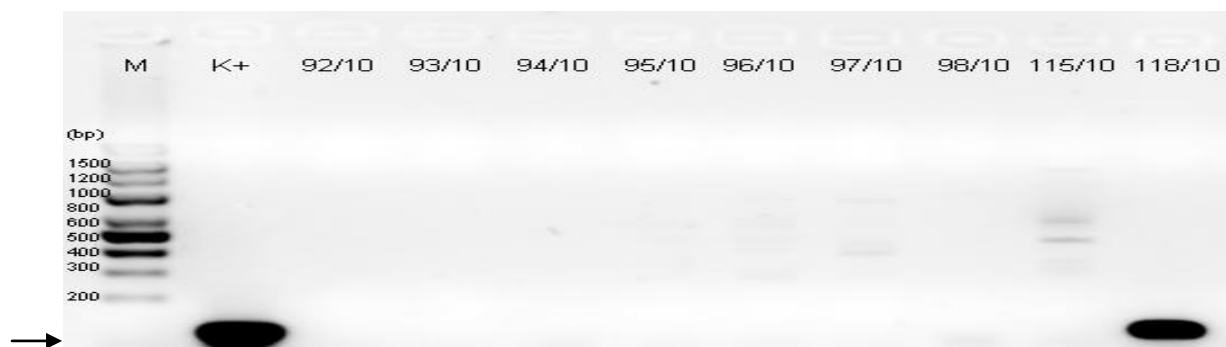
Legenda: M = DNA marker 200-1500 bp, K+ = pozitivní kontrola (geny *pvl*, amplikon o velikosti 433 bp), 92/10-120/10 = testované izoláty *S. aureus*.

Obr. 3: Elektroforetogram zobrazující detekci genu *tst* pomocí PCR u izolátu 102/10 *S. aureus*.



Legenda: M = DNA marker 200-1500 bp, K+ = pozitivní kontrola (gen *tst*, amplikon o velikosti 559 bp), 100/10-113/10 = testované izoláty *S. aureus*.

Obr. 4: Elektroforetogram zobrazující detekci genu *eta* pomocí PCR u izolátu 118/10 *S. aureus*.



Legenda: M = DNA marker 200-1500 bp, K+ = pozitivní kontrola (gen *eta*, amplicon o velikosti 93 bp), 92/10-118/10 = testované izoláty *S. aureus*.

Tab. 5: Souhrnný přehled výskytu detekovaných genů (*pvl*, *tst*, *eta* a *etb*) mezi studovanými izoláty *S. aureus*.

	Detekce genů pomocí PCR					Detekce genů pomocí PCR			
Izolát <i>S. aureus</i>	<i>pvl</i>	<i>tst</i>	<i>eta</i>	<i>etb</i>	Izolát <i>S. aureus</i>	<i>pvl</i>	<i>tst</i>	<i>eta</i>	<i>etb</i>
17/09	-	+	-	-	14/10	-	-	-	-
18/09	-	-	-	-	15/10	-	-	-	-
19/09	-	-	-	-	16/10	-	-	-	-
1/10	-	-	-	-	8/10	-	-	-	-
16/09	-	-	-	-	10/10	-	-	-	-
12/09	-	-	-	-	13/10	-	-	-	-
22104/A	-	-	-	-	12/10	-	-	-	-
2/10	-	-	-	-	78/10	-	-	-	-
11/09	-	-	-	-	79/10	-	+	-	-
20/10	-	-	-	-	80/10	-	-	-	-
21/10	-	-	-	-	81/10	-	-	-	-
19/10	-	-	-	-	82/10	-	-	-	-
17/10	-	-	-	-	83/10	-	-	-	-
18/10	-	-	-	-	84/10	-	+	-	-
9/10	-	-	-	-	85/10	-	-	-	-
11/10*	-	-	-	-	86/10	-	-	-	-

Legenda: + = pozitivní detekce genu, - = negativní detekce genu; * = MRSA.

Tab. 5: Souhrnný přehled výskytu detekovaných genů (*pvl*, *tst*, *eta* a *etb*) mezi studovanými izoláty *S. aureus* (pokračování).

	Detekce genů pomocí PCR					Detekce genů pomocí PCR			
Izolát <i>S. aureus</i>	<i>pvl</i>	<i>tst</i>	<i>eta</i>	<i>etb</i>	Izolát <i>S. aureus</i>	<i>pvl</i>	<i>tst</i>	<i>eta</i>	<i>etb</i>
87/10	-	-	-	-	121/10	-	-	-	-
88/10	-	-	-	-	122/10	-	-	-	-
89/10	-	-	-	-	123/10	-	-	-	-
90/10*	-	-	-	-	124/10	-	-	+	-
91/10*	-	-	-	-	126/10	-	-	-	-
100/10	+	-	-	-	127/10	-	-	-	-
102/10	-	+	-	-	128/10	-	+	-	-
103/10	-	-	-	-	7/11	-	-	-	-
104/10	-	-	-	-	22/11	-	-	-	-
105/10	-	-	+	-	23/11	-	-	-	-
106/10	-	-	-	-	24/11	-	-	-	-
107/10*	-	-	-	-	25/11	-	-	-	-
108/10	-	-	-	-	26/11	-	-	-	-
109/10	-	-	-	-	27/11	-	-	-	-
110/10	-	-	-	-	28/11	-	-	-	-
111/10	-	-	-	-	29/11	-	-	-	-
112/10	-	-	-	-	30/11	-	-	-	-
113/10	-	-	-	-	32/11	-	-	-	-
92/10	-	-	-	-	33/11	-	-	-	-
93/10	-	-	-	-	34/11	-	-	-	-
94/10	-	-	-	-	35/11	-	-	-	-
95/10	-	-	-	-	37/11	-	-	-	-
96/10	-	-	-	-	38/11	-	-	-	-
97/10	+	-	-	-	39/11	-	-	-	-
98/10	-	-	-	-	40/11	-	-	-	-
115/10	-	-	-	-	41/11	-	-	-	-
118/10	-	-	+	-	48/11	-	-	-	-
120/10	-	-	-	-	49/11	-	-	-	-
3/10	-	-	-	-	101/10*	-	-	-	-
4/10	-	-	-	-	129/10	-	-	-	-
5/10	-	-	-	-	1/11*	-	-	-	-
6/10	-	-	-	-	2/11	-	-	-	-
99/10	-	-	-	-					

Legenda: + = pozitivní detekce genu, - = negativní detekce genu; * = MRSA.

5.2.2 Charakteristika izolátů *S. aureus* pozitivních na testované geny

Diagnózy, věk a pohlaví pacientů, dále klinický materiál a nemocniční oddělení, ze kterých pocházely izoláty *S. aureus* pozitivní na geny *tst*, *eta* a *pvl* jsou shrnuty v **Tab. 6**.

Ve studovaném souboru 97 izolátů *S. aureus* byl nejčastěji detekován gen *tst* (u pěti izolátů). U třech izolátů byl detekován gen *eta* a ve dvou případech byla prokázána přítomnost genů *pvl*. Žádný izolát rezistentní k methicilinu nenesl gen pro produkci sledovaných toxinů.

Pozitivní izoláty nejčastěji pocházely z hnisajících ran (50 %, ve třech případech pozitivní na gen *tst* a ve dvou na geny *pvl*), dále z krve (40 %, ve dvou případech pozitivní na gen *eta* a ve dvou na *tst*) a jeden izolát (pozitivita na *eta*) pocházel z endosekretu (10 %).

Největší výskyt pozitivních izolátů byl zaznamenán na chirurgickém oddělení (30 %, ve dvou případech pozitivní na gen *eta* a v jednom na geny *pvl*), traumatologickém oddělení (20 %, pozitivita na *tst*) a hematologickém oddělení (20 %, pozitivita na *tst*). Na ORL (pozitivita na *pvl*), kožním oddělení (pozitivita na *tst*) a na oddělení chronické resuscitační a intenzivní péče byl jako pozitivní detekován pouze jeden izolát.

U pacientů, od kterých byly pozitivní izoláty odebrány, se nevyskytly projevy související s přítomností *S. aureus* produkujícího toxin - nebyl zaznamenán šokový stav po produkci superantigenů nebo destruktivní změny na kůži. Léčba běžnými antibiotiky u nich byla úspěšná. Diagnózy, se kterými byli pacienti hospitalizováni, jsou uvedeny v **Tab. 6**. Průměrný věk pacientů byl 56 let (věkové rozmezí 17-83 let) a z větší části se jednalo o muže (60 %).

Tab. 6: Charakteristika (typ klinického materiálu, nemocniční oddělení, diagnóza pacienta, věk a pohlaví pacienta) izolátů *S. aureus* pozitivních na jeden z genů kódujících extracelulární toxiny.

Detekovaný gen	Izolát <i>S. aureus</i>	Klinický materiál	Oddělení	Diagnóza pacienta	Věk pacienta [roky]/pohlaví
<i>tst</i>	17/09	Krev	Hematoonkologie	Lymfosarkom	68/ M
	79/10	Stěr z rány	Traumatologie	Fraktura dolní končetiny - zevní fixace	17/ Ž
	84/10	Stěr z rány	Traumatologie	Otevřená fraktura dolní končetiny	72/ M
	102/10	Stěr z rány	Kožní	Hnisavé onemocnění kůže	42/ Ž
	128/10	Krev	Hematoonkologie	Hypersplenismus	80/ Ž
<i>eta</i>	105/10	Endosekret	Chronická resuscitační a intenzivní péče	Chronické respirační selhání	39/ M
	118/10	Krev	Chirurgie	Zhoubný novotvar tlustého střeva	57/ Ž
	124/10	Krev	Chirurgie	Zánět žaludku	83/ M
<i>pvl</i>	100/10	Stěr z rány	Chirurgie	Absces palce dolní končetiny	63/ M
	97/10	Stěr z rány	ORL	Absces obličeje	35/ M

Legenda: M = muž, Ž = žena.

Pozn: Testovaný gen *etb* nebyl detekován u žádného izolátu *S. aureus*.

6 DISKUZE

S. aureus patří mezi oportunní patogeny poměrně běžně kolonizující kůži a sliznice zdravých jedinců, při poruchách přirozené odolnosti hostitele však může vyvolat onemocnění od banálních kožních infekcí až po smrtelně probíhající sepsi (Votava a Černohorská, 2003). V poslední době se hojně věnuje pozornost kmenům produkujícím extracelulární toxiny, významné faktory virulence. TSST-1 je často spojen se závažným onemocněním zvaným syndrom toxického šoku (McNamara a kol., 2009). Exfoliativní toxiny (ETA, ETB) jsou zodpovědné za většinu případů SSSS (Yamaguchi a kol., 2002). PVL je spojen s kožními abscesy a nekrotizujícími pneumoniemi (Petráš a kol., 2009). Tyto kmeny, zejména v kombinaci s rezistencí vůči methicilinu (MRSA), jsou velmi nebezpečné a mohou vést až ke smrti i u jinak zdravých mladých jedinců (Pajerek a kol., 2006; Heinige a kol., 2009; Petráš a kol., 2009).

Cílem experimentální části bakalářské práce bylo pomocí metody PCR zjistit četnosti výskytu genů kódujících extracelulární toxiny TSST-1, ETA, ETB a PVL. Dále určit vztah pozitivních izolátů *S. aureus* ke stavu a diagnóze pacientů hospitalizovaných ve Fakultní nemocnici Olomouc v letech 2009 až 2011. Zjištěné údaje byly porovnány se světovou literaturou.

6.1 Výskyt genů *pvl*, *tst*, *eta* a *etb* mezi izoláty *S. aureus*

Ve studovaném souboru 97 izolátů *S. aureus* byly geny *pvl* detekovány u 2,1 %, gen *tst* u 5,2 %, gen *eta* u 3,1 % a gen *etb* nebyl detekován u žádného z izolátů.

V anglické studii se Holmes a kol. (2005) zaměřili na detekci genů *pvl* v rámci souboru izolátů *S. aureus* získaného od pacientů s různými stafylokokovými infekcemi v letech 2002-2003. Ze 470 studovaných izolátů detekovali geny *pvl* u 4,9 % izolátů. V jiné anglické studii se Ellington a kol. (2007) zabývali detekcí genů *pvl* u izolátů odebraných od pacientů s bakteriemií. Z 244 odebraných izolátů bylo 1,6 % pozitivních.

Becker a kol. (2003) testovali soubor izolátů *S. aureus*, odebraných z krve pacientů hospitalizovaných v německých nemocnicích, na přítomnost genů kódujících PTSAgs a exfoliativní toxiny. Z 219 studovaných izolátů bylo 18,3 % pozitivních na *tst*, 0,5 % pozitivních na *eta* a 0,0 % pozitivních na *etb*.

Sauer a kol. (2008) studovali soubor MRSA izolátů pocházejících z Fakultní nemocnice Olomouc (z let 2005-2006) na přítomnost genů kódujících extracelulární faktory virulence. Ze 100 testovaných izolátů detekovali 2,0 % pozitivní na *tst*, 10 % pozitivních na *eta* a 0,0 % pozitivních na *etb* a na *pvl*.

Uvedené studie studovali soubor izolátů určité charakteristiky (konkrétní diagnóza nebo klinický materiál) nebo byl soubor tvořen MRSA izoláty. Na rozdíl od nich byly v této práci testovány izoláty získané od pacientů s různorodými závažnými až život ohrožujícími diagnózami, z různého klinického materiálu a soubor byl tvořen převážně MSSA izoláty (93,8 %). Proto se četnost detekovaných genů kódujících extracelulární toxiny od literatury v určité míře liší. Výjimku tvoří gen *etb*, který nebyl detekován v žádné studii, stejně jako v případě této práce.

Většina uvedených studií je zahraničních, tudíž dalším faktorem rozdílného procenta výskytu detekovaných faktorů může být jiná epidemiologická situace v různých světových zemích, která je patrna ze studií Kawabata a kol. (1997) a Parsonnet a kol. (2005).

Ani jeden z šesti studovaných MRSA izolátů nebyl pozitivní na žádný z testovaných genů (*pvl*, *tst*, *eta* a *etb*). To je v souladu s výsledky dřívější studie Ellington a kol. (2007), jejichž studovaný soubor izolátů byl taktéž tvořen především MSSA, ale z 36 % MRSA izolátů nebyl žádný pozitivní na geny *pvl*. Také ze studie Kawabata a kol. (1997) vyplývá, že MRSA izoláty produkují exfoliativní toxiny méně často než MSSA.

6.2 Vztah izolátů pozitivních na detekované geny k diagnóze a stavu pacientů

Oba *pvl* pozitivní izoláty byly získány z abscesů, což odpovídá výsledkům dřívějších studií, kdy byly *pvl* pozitivní *S. aureus* nejčastěji izolovány při infekcích kůže a měkkých tkání, převážně z abscesů (Lina a kol., 1999; Holmes a kol., 2005; Issartel a kol., 2005). Izoláty pozitivní na *tst* byly získány od pacientů s rozdílnými diagnózami (malignitida, fraktury a další), což by mohlo odpovídat výsledkům studie Descloux a kol. (2008), kde byl gen *tst* detekován v případě různých typů infekce *S. aureus*. Výskyt *eta* pozitivních izolátů nebyl pozorován u pacientů s kožními chorobami, jak bylo očekáváno (Yamaguchi a kol., 2002; Ladhani, 2003; Yamasaki a kol., 2005b), ale u pacientů s jinými diagnózami (malignitida, respirační selhání, zánět žaludku).

Izoláty pozitivní na přítomnost genů *pvl*, *tst* nebo *eta* byly odebrány od pacientů, u kterých nebylo pozorováno zhoršení zdravotního stavu v důsledku účinků detekovaného toxinu (toxický šok nebo destruktivní změny kůže). Může to být vysvětleno tím, že v této práci nebyla detekována přímo produkce extracelulárních toxinů, ale pouze geny, které je kódují. Izoláty pozitivní na geny tudíž nemusely toxiny buď vůbec produkovat - geny kódující toxiny nebyly exprimovány, nebo jejich exprese byla jen velmi slabá. Toto vysvětlení je v souladu se studií Becker a kol. (2003), kde byl takto zdůvodněn cca o 10 % vyšší výskyt izolátů s pozitivitou na geny kódující PTSAgs oproti výskytu samotných toxinů. Kromě toho mohly být v těle pacientů vytvořeny protilátky proti detekovaným toxinům, takže i kdyby příslušný izolát toxin produkoval, na stavu pacienta by se jeho účinek neprojevil (přítomnost protilátek byla prokázána v sérech sledovaných jedinců ve studiích Parsonnet a kol., 2005 a Yamasaki a kol., 2005).

7 ZÁVĚR

V bakalářské práci byly shrnuty dosavadní poznatky o faktorech virulence *Staphylococcus aureus* se zaměřením na extracelulární toxiny. Dále byly popsány metody detekce těchto toxinů.

V praktické části byly pomocí metody PCR detekovány geny kódující významné faktory virulence - extracelulární toxiny PVL, TSST-1, ETA a ETB u izolátů *S. aureus*. 97 studovaných vzorků pocházelo z Fakultní nemocnice Olomouc sbíraných v letech 2009 až 2011. Předmětem práce bylo dále získat přehled o vztahu izolátů pozitivních na detekované geny k diagnóze a závažným klinickým stavům.

V testovaném souboru byl detekován jeden z genů - *pvl*, *tst* nebo *eta* pouze u malého procenta izolátů *S. aureus* (10,3 %) a gen *etb* nebyl prokázán vůbec. Navíc i v případě pozitivní detekce nebylo pozorováno zhoršení zdravotního stavu v důsledku účinku toxinu u pacienta, od kterého byl izolát odebrán, a souvislost se závažnou diagnózou nebyla jednoznačně prokázána. Také je nutno zmínit, že žádný z pozitivních izolátů nevykazoval rezistenci vůči methicilinu, která je u stafylokových infekcí považována za nebezpečný faktor podobně jako produkce extracelulárních toxinů.

Vzhledem k pouhé detekci genů kódujících extracelulární toxiny v této práci by bylo vhodné zaměřit případný další výzkum na přímou detekci toxinů. Tím by se ze studie vyloučili kmeny obsahující v genomu příslušný gen, ale neprodukující příslušný toxin. Také by mohlo být přínosné detekovat hladiny protilátek v sérech pacientů pro zjištění, jakou mírou je toxin v organismu inhibován.

Na základě zjištěných dat můžeme říci, že ve Fakultní nemocnici Olomouc se v rozmezí let 2009-2011 vyskytovaly izoláty *S. aureus* pozitivní na sledované geny jen ve velmi malé míře, stejně jako izoláty rezistentní k methicilinu. Žádný z nich nepředstavoval zvýšené riziko pro hospitalizované pacienty, což svědčí o dobré míře hygienicko-epidemiologických podmínek.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

A	adenin
<i>agr</i>	<i>accessory gene regulator</i>
BAL	bronchoalveolární laváž
bp	<i>base pairs</i> , páry bází
C	cytozin
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTPs	deoxyribonukleotid trifosfáty
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ETA, ETB, ETC, ETD	exfoliativní toxiny A, B, C, D
ETs	exfoliativní toxiny
G	guanin
KNS	koagulasanegativní stafylokoky
MRSA	methicilin-rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>
MSSA	methicilin-senzitivní <i>Staphylococcus aureus</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , polymerázová řetězová reakce
PTSAgs	<i>pyrogenic toxin superantigenes</i> , pyrogenní superantigenní toxiny
PVL	Pantonův-Valentinův leukocidin
RNA	ribonukleová kyselina
RPLA	<i>reverse passive latex agglutination</i> , reverzní pasivní latexová aglutinace
RT-PCR	<i>Reverse Transcriptase PCR</i> , reverzně-transkriptázová PCR

SEA až SEI, SER, SES, SET	stafylokokové enterotoxiny A až I, R, S, T
SEI	<i>enterotoxin-like toxins</i> , enterotoxinům podobné toxiny
SEIJ až SEIV	<i>enterotoxin-like toxins J to V</i> , enterotoxinům podobné toxiny J až V
SEs	stafylokokové enterotoxiny
SSSS	<i>staphylococcal scalded skin syndrome</i> , stafylokokový syndrom opárené kůže
T	tymin
TCR	<i>T-cell antigen receptor</i> , receptor T-lymfocytu
TSS	<i>toxic shock syndrome</i> , syndrom toxického šoku
TSST-1	<i>toxic-shock syndrome toxin-1</i> , toxin-1 syndromu toxického šoku

9 LITERATURA

- Al-Talib, H., Yean, Ch. Y., Al-Khateeb, A., Hassan, H., Singh, K.-K. B., Al-Jashamy, K., Ravichandran, M. (2009): A pentaplex PCR assay for the rapid detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and Panton-Valentine Leucocidin. BMC Microbiology 9: 1-8.
- Arbuthnott, J. P. (1999): Stafylokoky: Infekce kůže a ran; absces; osteomyelitida; alimentární intoxikace. In: Greenwood, D., Slack R. C. B., Peutherer, J. F., Arbuthnott, J. P., Peutherer, J. F. a kol., (ed.): Lékařská mikrobiologie, Přehled infekčních onemocnění: patogeneze, imunita, laboratorní diagnostika a epidemiologie, Grada Publishing, Praha, pp. 181-187 (překlad).
- Balaban, N., Rasooly, A. (2000): Staphylococcal enterotoxins. International Journal of Food Microbiology 61: 1-10.
- Becker, K., Friedrich, A. W., Lubritz, G., Weilert, M., Peters, G., von Eiff, Ch. (2003): Prevalence of genes encoding pyrogenic toxin superantigens and exfoliative toxins among strains of *Staphylococcus aureus* isolated from blood and nasal specimens. Journal of Clinical Microbiology 41: 1434-1439.
- Bednář, M., Fraňková V., Schindler J., Souček A., Vávra J. (1996): Lékařská mikrobiologie. Marvil, Praha.
- Descloux, E., Perpoint, T., Ferry, T., Lina, G., Bes, M., Vandenesch, F., Mohammedi, I., Etienne, J. (2008): One in five mortality in non-menstrual toxic shock syndrome versus no mortality in menstrual cases in a balanced French series of 55 cases. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases 27: 37-43.
- Di Pinto, A., Forte, V. T., Ciccarese, G., Conversano, M. C., Tantillo, G. M. (2004): Comparison of reverse passive latex agglutination test and immunoblotting for detection of staphylococcal enterotoxin A a B. Journal of Food Safety 24: 231-238.
- Dinges, M. M., Orwin, P. M., Schlievert, P. M. (2000): Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. Clinical Microbiology Reviews 13: 16-34.
- Dumitrescu, O., Badiou, C., Bes, M., Reverdy, M. E., Vandenesch, F., Etienne, J., Lina, G. (2008): Effect of antibiotics, alone and in combination, on Panton-Valentine leukocidin production by a *Staphylococcus aureus* reference strain. Clinical Microbiology and Infection 14: 384-388.
- Ellington, M. J., Hope, R., Ganner, M., Ganner, M., East, C., Brick, G., Kearns, A. M. (2007): Is Panton-Valentine leucocidin associated with the pathogenesis of *Staphylococcus aureus* bacteraemia in the UK? Journal of Antimicrobial Chemotherapy 60: 402-405.

- Euzéby, J. P. (2010): List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature. Publikováno online v IJSEM 3. 11. 2010 [cit 30. 11. 2010]. Dostupné z: <http://www.bacterio.cict.fr/classifgenerafamilies.html#Staphylococcaceae>, <http://www.bacterio.cict.fr/classiffamilies.html#Staphylococcaceae>.
- Euzéby, J. P. (2010): List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature - Genus *Staphylococcus*. Publikováno online v IJSEM 3. 11. 2010 [cit 30. 11. 2010]. Dostupné z: <http://www.bacterio.cict.fr/s/staphylococcus.html>.
- Ewald, S., Heuvelman, C. J., Notermans, S. (1990): The use of DNA probes for confirming enterotoxin production by *Staphylococcus aureus* and micrococci. International Journal of Food Microbiology 11: 251-258.
- Gill, S. R., Fouts, D. E., Archer, G. L., Mongodin, E. F., Deboy, R. T., Ravel, J., Paulsen, I. T., Kolonay, J. F., Brinkac, L., Beanan, M., Dodson, R. J., Daugherty, S. C., Madupu, R., Angiuoli, S. V., Durkin, A. S., Haft, D. H., Vamathevan, J., Khouri, H., Utterback, T., Lee, C., Dimitrov, G., Jiang, L., Qin, H., Weidman, J., Tran, K., Kang, K., Hance, I. R., Nelson, K. E., Fraser, C. M. (2005): Insights on evolution of virulence and resistance from the complete genome analysis of an early methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain and a biofilm-producing methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* strain. Journal of Bacteriology 187: 2426-2438.
- Gilligan, K., Shipley, M., Stiles, B., Hadfield, T. L., Ibrahim, M. S. (2000): Identification of *Staphylococcus aureus* enterotoxins A and B genes by PCR-ELISA. Molecular and Cellular Probes 14: 71-78.
- Heinige, P., Dedek, V., Fajt, M., Havránek, J., Pohl, J., Sádlo, M., Petráš, P., Machová, I., Pavlíček, P., Dlask, K., Ambrožová, H., Marešová, V. (2009): Nekrotizující pneumonie kojence s fatálním průběhem, způsobená PVL pozitivním zlatým stafylokokem. Pediatrie pro praxi 10 (5): 326-328.
- Holmes, A., Ganner, M., McGuane, S., Pitt, T. L., Cookson, B. D., Kearns, A. M. (2005): *Staphylococcus aureus* isolates carrying Panton-Valentine leucocidin genes in England and Wales: Frequency, characterization, and association with clinical disease. Journal of Clinical Microbiology 43: 2384-2390.
- Hu, D.-L., Zhu, G., Mori, F., Omoe, K., Okada, M., Wakabayashi, K., Kaneko, S., Shinagawa, K., Nakane, A. (2007): Staphylococcal enterotoxin induces emesis through increasing serotonin release in intestine and it is downregulated by cannabinoid receptor 1. Cellular Microbiology 9: 2267-2277.
- Issartel, B., Tristan, A., Lechevallier, S., Bruyère, F., Lina, G., Garin, B., Lacassin, F., Bes, M., Vandenesch, F., Etienne, J. (2005): Frequent carriage of Panton-Valentine leucocidin genes by *Staphylococcus aureus* isolates from surgically drained abscesses. Journal of Clinical Microbiology 43: 3203-3207.

- Jackson, M. P., Iandolo, J. J. (1986): Sequence of the exfoliative toxin B gene of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology* 167: 726-728.
- Jönsson, K., Signäs, Ch., Müller, H.-P., Lindberg, M. (1991): Two different genes encode fibronectin binding proteins in *Staphylococcus aureus*. *European Journal of Biochemistry* 202: 1041-1048.
- Kawabata, A., Ichiyama, S., Iinuma, Y., Hasegawa, Y., Ohta, M., Shimokata, K. (1997): Exfoliative toxin detection using reversed passive latex agglutination: Clinical and Epidemiologic Applications. *Journal of Clinical Microbiology* 35: 1984-1987.
- Koukalová, D., Kolář, M., Vágnerová, I., Hejnar, P., Hamal, P., Bardoň, J., Došlík, V., Horák, V., Kohnová, I., Lovečková, Y., Sauer, P., Slepíčková, S. (2005): Praktická cvičení z lékařské mikrobiologie II. Lékařská fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc.
- Ladhani, S. (2003): Understanding the mechanism of action of the exfoliative toxins of *Staphylococcus aureus*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 39: 181-189.
- Lee, Ch. Y., Schmidt, J. J., Johnson-Winegar, A. D., Spero, L., Iandolo, J. J. (1987): Sequence determination and comparison of the exfoliative toxin A and toxin B genes from *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology* 169: 3904-3909.
- Letertre, C., Perelle, S., Dilasser, F., Fach, P. (2003): Detection and genotyping by real-time PCR of the staphylococcal enterotoxin genes *sea* to *sej*. *Molecular and Cellular Probes* 17: 139-147.
- Lina, G., Piémont, Y., Godail-Gamot, F., Bes, M., Peter, M.-O., Gauduchon, V., Vandenesch, F., Etienne, J. (1999): Involvement of Panton-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. *Clinical Infectious Diseases* 29: 1128-1132.
- McNamara, P. J., Syverson, R. E., Milligan-Myhre, K., Frolova, O., Schroeder, S., Kidder, J., Hoang, T., Proctor, R. A. (2009): Surfactants, aromatic and isoprenoid compounds, and fatty acid biosynthesis inhibitors suppress *Staphylococcus aureus* production of toxic shock syndrome toxin 1. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 53: 1898–1906.
- Mehrotra, M., Wang, G., Johnson, W. M. (2000): Multiplex PCR for detection of genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin 1, and methicillin resistance. *Journal of Clinical Microbiology* 38: 1032-1035.
- Monday, S. R., Bohach, G. A. (1999): Use of multiplex PCR to detect classical and newly described pyrogenic toxin genes in staphylococcal isolates. *Journal of Clinical Microbiology* 37: 3411-3414.

- Monday, S. R., Vath, G. M., Ferens, W. A., Deobald, C., Rago, J. V., Gahr, P. J., Monie, D. D., Iandolo, J. J., Chapes, S. K., Davis, W. C., Ohlendorf, D. H., Schlievert, P. M., Bohach G. A. (1999): Unique superantigen activity of staphylococcal exfoliative toxins. *The Journal of Immunology* 162: 4550-4559.
- Montanaro, L., Arciola, C. R., Baldassarri, L., Borsetti, E. (1999): Presence and expression of collagen adhesin gene (*cna*) and slime production in *Staphylococcus aureus* strains from orthopaedic prosthesis infections. *Biomaterials* 20: 1945-1949.
- O'Gara, J. P., Humphreys, H. (2001): *Staphylococcus epidermidis* biofilms: importance and implications. *Journal of Medical Microbiology* 50: 582-587.
- Oishi, K., Baba, T., Nakatomi, Y., Ito, T., Hiramatsu, K. (2008): A latex agglutination assay for specific detection of Pantón–Valentine leukocidin. *Journal of Microbiological Methods* 75: 411-415.
- Pajerek, J., Přibíková, R., Petráš, P. (2006): Syndrom toxického šoku. *Pediatrica pre prax* 6: 324-326.
- Parsonnet, J., Hansmann, M. A., Delaney, M. L., Modern, P. A., DuBois, A. M., Wieland-Alter, W., Wissemann, K. W., Wild, J. E., Jones, M. B., Seymour, J. L., Onderdonk, A. B. (2005): Prevalence of toxic shock syndrome toxin 1-producing *Staphylococcus aureus* and the presence of antibodies to this superantigen in menstruating women. *Journal of Clinical Microbiology* 43: 4628-4634.
- Paulík, M. (2005): Metody užívané k vyšetřování složek humorální imunity. In: Bartůňková, J., Paulík, M., (ed.): *Vyšetřovací metody v imunologii*, Grada Publishing, Praha, pp. 43-63.
- Peterson, M. L., Ault, K., Kremer, M. J., Klingelhutz, A. J., Davis, C. C., Squier, Ch. A., Schlievert, P. M. (2005): The innate immune system is activated by stimulation of vaginal epithelial cells with *Staphylococcus aureus* and toxic shock syndrome toxin 1. *Infection and Immunity* 73: 2164-2174.
- Petráš, P., Ježek, P., Machová, I., Bílina, P., Fiala, J. (2009): Další smrtelný případ pneumonie vyvolaný kmenem *Staphylococcus aureus* s produkcí Pantonova-Valentinova leukocidinu. *Zprávy EM (SZÚ, Praha)* 18 (1): 15-17.
- Pingoud, A., Urbanke, C., Hoggett, J., Jeltsch, A. (2002): Immunological methods. In: Pingoud, A., Urbanke, C., Hoggett, J., Jeltsch, A., (ed.): *Biochemical methods*, Wiley-VCH, Weinheim, pp. 219-237.
- Ryšková, O., Ryšková, L., Hanovcová, I., Lesná, J. (2004): Bakteriologie. In: Ryšková, O., Hubková, V., Slezák, R., Hanovcová, I., Lesná, J., Horáček, J., Ryšková, L., (ed.): *Mikrobiologie pro studující zubní lékařství*, Karolinum (UK v Praze), Praha, pp. 61-97.

- Sauer, P., Síla, J., Štosová, T., Večeřová, R., Hejnar, P., Vágnerová, I., Kolář, M., Raclavský, V., Petrželová, J., Lovečková, Y., Koukalová, D. (2008): Prevalence of genes encoding extracellular virulence factors among meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from the University Hospital, Olomouc, Czech Republic. *Journal of Medical Microbiology* 57: 403-410.
- Sergeev, N., Volokhov, D., Chizhikov, V., Rasooly, A. (2004): Simultaneous analysis of multiple staphylococcal enterotoxin genes by an oligonucleotide microarray assay. *Journal of Clinical Microbiology* 42: 2134-2143.
- Snustad, D. P., Simmons, M. J. (2009): Metody molekulární genetiky. In: Snustad, D. P., Simmons, M. J., (ed.): *Genetika*, Nakladatelství Masarykova univerzita, Brno, pp. 423-460 (překlad).
- Šmarda, J., Doškař, J., Pantůček, R., Růžicková, V., Koptíková, J. (2005): *Metody molekulární biologie*. Nakladatelství Masarykova univerzita, Brno.
- Špišek, R. (2005): *Metody molekulární biologie*. In: Bartůňková, J., Paulík, M., (ed.): *Vyšetřovací metody v imunologii*, Grada Publishing, Praha, pp. 91-100.
- Vasconcelos, N. G., Cunha, M. L. R. S. (2010): Staphylococcal enterotoxins: Molecular aspects and detection methods. *Journal of Public Health and Epidemiology* 2 (3): 29-42.
- Votava, M., Černohorská, L. (2003): Grampozitivní aerobní a fakultativně anaerobní koky. In: Votava, M., Černohorská, L., Heroldová, M., Holá, V., Mejzlíková, L., Ondrovčík, P., Růžicka, F., Dvořáčková, M., Woznicová, V., Zahradníček, O., (ed.): *Lékařská mikrobiologie speciální*, Neptun, Brno, pp. 98-128.
- Yamaguchi, T., Nishifuji, K., Sasaki, M., Fudaba, Y., Aepfelbacher, M., Takata, T., Ohara, M., Komatsuzawa, H., Amagai, M., Sugai, M. (2002): Identification of the *Staphylococcus aureus* *etd* pathogenicity island which encodes a novel exfoliative toxin, ETD, and EDIN-B. *Infection and Immunity* 70: 5835-5845.
- Yamasaki, O., Kaneko, J., Morizane, S., Akiyama, H., Arata, J., Narita, S., Chiba, J., Kamio, Y., Iwatsuki, K. (2005a): The association between *Staphylococcus aureus* strains carrying Panton-Valentine leukocidin genes and the development of deep-seated follicular infection. *Clinical Infectious Diseases* 40: 381-385.
- Yamasaki, O., Yamaguchi, T., Sugai, M., Chapuis-Cellier, C., Arnaud, F., Vandenesch, F., Etienne, J., Lina, G. (2005b): Clinical manifestations of staphylococcal scalded-skin syndrome depend on serotypes of exfoliative toxins. *Journal of Clinical Microbiology* 43: 1890-1893.