MASARYKOVA UNIVERZITA
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
ÚSTAV EXPERIMENTÁLNÍ BIOLOGIE

Diplomová práce

Brno 2015 **Lenka Fišarová**

MASARYKOVA UNIVERZITA
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
ÚSTAV EXPERIMENTÁLNÍ BIOLOGIE

Molekulární charakterizace plazmidů koaguláza-negativních stafylokoků

Diplomová práce

Lenka Fišarová

Vedoucí práce: prof. RNDr. Jiří Doškař, CSc. **Brno 2015**

Bibliografický záznam

Autor:	Bc. et Bc. Lenka Fišarová Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita Ústav experimentální biologie
Název práce:	Molekulární charakterizace plazmidů koaguláza-negativních stafylokoků
Studijní program:	Experimentální biologie
Studijní obor:	Speciální biologie
Vedoucí práce:	prof. RNDr. Jiří Doškař, CSc.
Akademický rok:	2014/2015
Počet stran:	90
Klíčová slova:	koaguláza-negativní stafylokoky; plazmidy; rezistence k antibiotikům; restrikční analýza; geny rezistence; shoda plazmidů; horizontální přenos

Bibliographic Entry

Author:	Bc. et Bc. Lenka Fišarová Faculty of Science, Masaryk University Department of Experimental Biology
Title of Thesis:	Molecular characterization of plasmids in coagulase-negative staphylococci
Degree programme:	Experimental Biology
Field of Study:	Special Biology
Supervisor:	prof. RNDr. Jiří Doškař, CSc.
Academic Year:	2014/2015
Number of Pages:	90
Keywords:	coagulase-negative staphylococci; plasmids; antimicrobial resistance; restriction analysis; resistance genes; plasmid match; horizontal transfer

Abstrakt

Koaguláza-negativní stafylokoky jsou známé především jako komenzálové na těle člověka a zvířat, mohou však způsobovat onemocnění, především u oslabených jedinců a pacietů s umělými tělními náhradami. Často bývají rezistentní k antibiotikům a geny rezistence mohou být umístěny na mobilních genetických elementech, jako jsou plazmidy. Rezistence se tak může šířit na jiné druhy bakterií. Cílem práce bylo odhalit rezistenci k antibiotikům u vybraných kmenů koaguláza-negativních stafylokoků, analyzovat jejich plazmidy, srovnat je mezi sebou a detekovat na nich geny způsobující tuto rezistenci. Většina kmenů byla rezistentní alespoň na jedno antibiotikum, mnohé kmeny byly rezistentní k většímu počtu antibiotik. Většina analyzovaných kmenů obsahovala také větší počet plazmidů. V případě rezistence k tetracyklinu a erytromycinu bylo detekováno několik genů rezistence. Pomocí restrikčního štěpení byly odhaleny plazmidy shodné u kmenů *S. aureus*, *S. haemolyticus* a *S. petrasii*, což svědčí o jejich horizontálním přenosu.

Abstract

Coagulase-negative staphylococci are mostly known as comensals on the body of both humans and animals. However, they can cause disease, especially in weakened individuals and patients with various medical devices. They are often resistant to antimicrobials and the resistance genes can be carried on mobile genetic elements such as plasmids. Therefore, resistance can be spread onto different bacterial species. The goal of this thesis was to reveal resistance in several strains of coaguase-negative staphylococci, to analyze their plasmids, compare them and detect their resistance genes. Most strains were resistant to at least one antibiotic, many of them to more antibiotics. Most of the analyzed strains also contained a higher number of plasmids. In case of tetracycline and erythromycin resistance, several resistance genes were detected. Restriction cleavage revealed similarity of plasmids in *S. aureus*, *S. haemolyticus* and *S. petrasii* strains, which suggests horizontal transfer of the plasmids.

Vysoká škola: Masarykova univerzita

Fakulta: přírodovědecká

Pracoviště: Ústav experimentální biologie

Akademický rok: 2013/2014

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Magisterský studijní program: Experimentální biologie

Studijní obor: Speciální biologie, směr Mikrobiologie a molekulární biotechnologie

Student(ka): Bc. et Bc. Lenka Fišarová

Vedoucí diplomové práce Vám ve smyslu zákona vlády ČR č. 111/1998 Sb., čl. o státních závěrečných zkouškách a státních rigorózních zkouškách, určuje tuto diplomovou práci:

Název tématu: Molekulární charakterizace plazmidů koaguláza negativních stafylokoků

Název tématu anglicky: Molecular characterization of plasmids in coagulase-negative staphylococci

Vedoucí diplomové práce: Prof. RNDr. Jiří Doškař, CSc.

Zásady pro vypracování

Anotace:

Cílem diplomové práce je charakterizovat nejčastěji se vyskytující typy plazmidů u koaguláza-negativních druhů stafylokoků, zejména u těch, které jsou potenciálně patogenní pro člověka. U vybraných kmenů druhů, *S. haemolyticus, S. sciuri* a *S. petrasii* bude nejdříve provedena izolace plazmidové DNA a její restrikční analýza za účelem stanovení velikosti plazmidů. Dále bude proveden metodou PCR důkaz přítomnosti genů pro rezistenci k antibiotikům potenciálně lokalizovaných na plazmidech. Přítomnost těchto genů bude korelována s rezistencí kmenů k antibiotikům zjištěnou fenotypovými testy. Charakteristiky plazmidů budou pomocí bioinformatických nástrojů srovnány s dosud popsanými plazmidy u stafylokoků, včetně plazmidů druhu *S. aureus*. Práce by měla přispět k objasnění variability mobilních elementů u druhů r. *Staphylococcus* a jejich úlohy v evoluci studovaných druhů.

Časový harmonogram řešení (postup):

PS 2013/14, JS 2013/14: Studium literatury (průběžně) – články v odborných časopisech, monografie, internetové zdroje. Zahájení experimentálních prací: Výběr kmenů, kultivace bakterií, izolace plazmidové DNA, restrikční analýza, průkaz genů ANT-R pomocí PCR.
PS 2013/14: Dokončení experimentálních prací, bioinformatická analýza plazmidů.
JS 2014/15: Sepsání a odevzdání DP.

Rozsah diplomové práce: nejméně 50 stran

Rozsah grafických příloh: bez omezení

Jazyk práce: český

Doporučená literatura:
články v odborných časopisech, monografie, internetové zdroje.

Datum zadání diplomové práce: 10.10.2013

Termín odevzdání diplomové práce:

Termín odevzdání diplomové práce dle harmonogramu příslušného akademického roku.

V Brně dne:

Fišarová

podpis studenta

podpis vedoucího diplomové práce

ředitel ústavu

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla poděkovat vedoucímu diplomové práce prof. RNDr. Jiřímu Doškařovi, CSc. za cenné rady při zpracování diplomové práce, dále Mgr. Marianovi Vargovi, Ph.D. za konzultace a všem ostatním pracovníkům Laboratoře molekulární diagnostiky mikroorganismů.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svoji diplomovou práci vypracovala samostatně s využitím informačních zdrojů, které jsou v práci citovány.

Brno 3. měsíce 2015 ……

Lenka Fišarová

Obsah

Seznam zkratek……11

1. Úvod……12

1.1 Koaguláza-negativní stafylokoky……12

1.1.1 *Staphylococcus haemolyticus*……16

1.1.2 *Staphylococcus sciuri*……17

1.1.3 *Staphylococcus petrasii*……18

1.2 Rezistence k antibiotikům……21

1.2.1 Mechanizmy účinku antibiotik……21

1.2.2 Mechanizmy rezistence k antibiotikům……22

1.2.3 Rezistence k meticilinu……23

1.2.4 Rezistence k inhibitorům proteosyntézy……24

1.2.5 Rezistence k antibiotikům v různých prostředích……28

1.3 Horizontální přenos genů……31

1.3.1 Plazmidy u stafylokoků……33

1.3.2 Plazmidy s geny rezistence k inhibitorům proteosyntézy……33

1.3.3 Rezistence k antibiotikům spojená s velkými plazmidy……35

1.3.4 R-plazmidy u stafylokoků z různých prostředí……36

1.3.5 Genetické elementy podílející se na přenosu……37

2. Cíle práce……39

3. Materiál a metody……40

3.1 Bakteriální kmeny……40

3.2 Kultivační média, roztoky a chemikálie……41

3.3 Pomůcky a přístroje……46

3.4 Pracovní postupy……49

3.4.1 Izolace plazmidové DNA……49

3.4.2 Gelová elektroforéza……52
3.4.3 Restrikční analýza plazmidů……52
3.4.4 Testování rezistence k antibiotikům……52
3.4.5 Uchovávání bakteriálních kultur……53
3.4.6 Eliminace plazmidů……53
3.4.7 Izolace celkové DNA kmenů po eliminaci plazmidů……54
3.4.8 Detekce genů rezistence k antibiotikům……54
4. Výsledky……56
4.1 Rezistence k antibiotikům……56
4.2 Stanovení obsahu plazmidů……57
4.3 Restrikční analýza plazmidů……60
4.4 Srovnání plazmidů různých druhů KNS……64
4.5 Eliminace plazmidů……66
4.6 Detekce genů rezistence k antibiotikům……68
5. Diskuze……72
5.1 Testování rezistence k antibiotikům……72
5.2 Stanovení přítomnosti plazmidů……72
5.3 Restrikční analýza plazmidů……73
5.4 Srovnání plazmidů různých druhů KNS……74
5.5 Eliminace plazmidů……75
5.6 Detekce genů rezistence k antibiotikům……76
6. Závěr……78
7. Použitá literatura……80

Seznam zkratek

EUCAST…….The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, Evropská komise pro testování antimikrobiální citlivosti

IS…….inzerční sekvence

KNS……....koaguláza-negativní stafylokoky

MGE……mobilní genetické elementy

MHA…..……....Mueller-Hintonův agar

MIC……minimální inhibiční koncentrace

MPA……masopeptonový agar

MPB……masopeptonový bujón

MRKNS…… meticilin-rezistentní koaguláza-negativní stafylokoky

MRSA……meticilin-rezistentní *Staphylococcus aureus*

NRL/St……Národní referenční laboratoř pro stafylokoky

OD……optická denzita

ORF…….open fading frame, otevřený čtecí rámec

PBS……...phosphate buffered saline, fosfátový pufr

PCR……polymerase chain reaction, polymerázová řetězová reakce

RE……restrikční endonukleáza

SDS……sodium dodecyl sulphate, dodecylsulfát sodný

UTI……...urinary tract infection, infekce močového traktu

1. Úvod

1.1 Koaguláza-negativní stafylokoky

KNS jsou bakterie známé především jako neškodní komenzálové na lidském těle. Na rozdíl od koaguláza-pozitivního *Staphylococcus aureus*, který je častým původcem onemocnění, byly KNS vědci dlouho opomíjeny. Onemocnění způsobená KNS jsou spojená především s tvorbou biofilmu na katetrech a umělých tělních náhradách, patří mezi ně však také různá onemocnění oslabených jedinců (např. léčených chemoterapeutiky) i zdravých lidí. KNS jsou značně rezistentní k antibiotikům, rezistence je kódována především geny umístěnými na mobilních genetických elementech (inzerčních sekvencích, transpozonech, plazmidech a integrovaných bakteriofázích). KNS tedy mohou sloužit jako rezervoár genů rezistence pro jiné druhy bakterií, například pro *S. aureus*.

KNS jsou grampozitivní koky vyskytující se převážně ve shlucích. Produkují katalázu, ale netvoří koagulázu, která způsobuje srážení krve. Jsou fakultativně anaerobní, chemoorganotrofní a žijí v prostředí s vysokou salinitou. Na krevním agaru mohou způsobovat hemolýzu. Jejich genom obsahuje 30-40 % G+C a má velikost 2-3 Mb. Taxonomicky jsou řazeny do domény *Bacteria*, kmene *Firmicutes*, třídy *Bacilli*, řádu *Bacillales* a čeledě *Staphylococcaceae* (Sedláček, 2007). KNS se často nacházejí na kůži a sliznicích člověka (Kloos a Musselwhite, 1975; Tab. 1). Některé druhy (např. *S. sciuri*, *S. equorum*, *S. gallinarum*, *S. carnosus*, *S. caseolyticus* a *S. hyicus*) se nachází převážně nebo výhradně u zvířat a ve zvířecích produktech. KNS mohou být izolovány také z prostředí.

Možná patogenita KNS byla poprvé zaznamenána v 60. letech 20. století (Kloos a Bannerman, 1994). Později byly KNS považovány za původce endokarditidy a infekce ran. V roce 1971 byly zkoumány pyogenní infekce způsobené KNS. Jako původci UTI byly KNS známy od roku 1962. V roce 1971 byla objevena kolonizace ventrikuloatriálních katetrů a v 80. letech 20. století už jsou KNS známy jako původci mnoha onemocnění.

Tabulka 1. Převažující druhy KNS na lidském těle (Kloos a Musselwhite, 1975; upraveno).

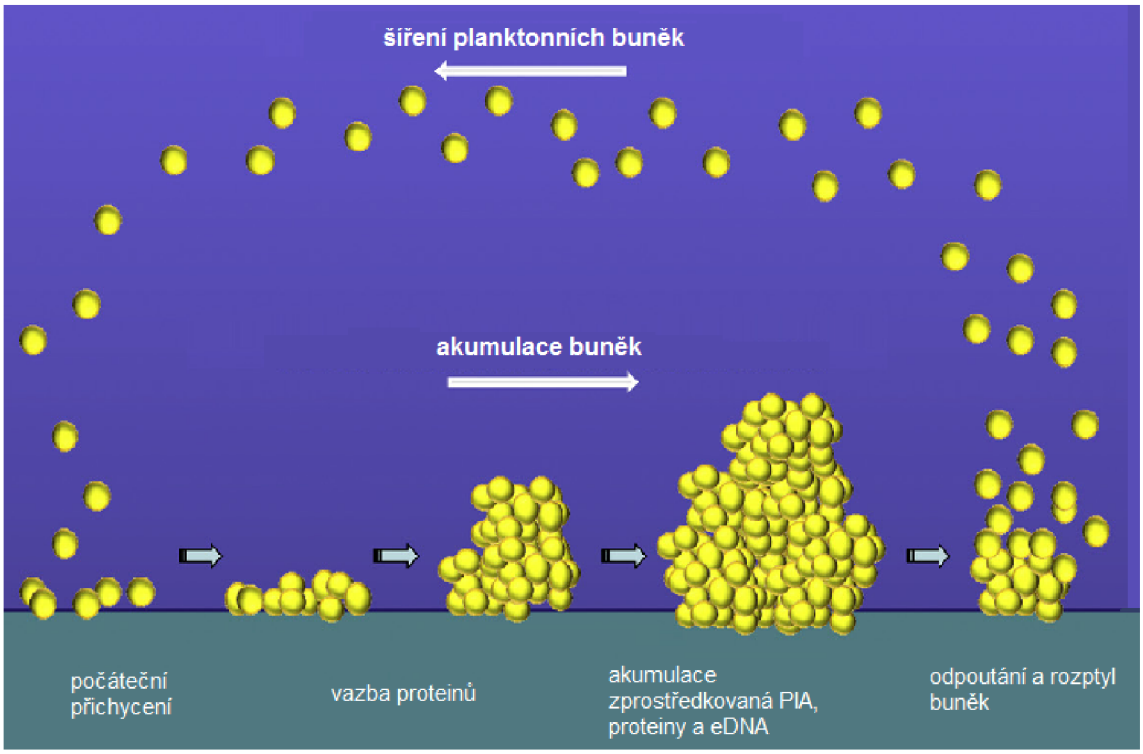
	nos	axila	hlava	končetiny	ucho
S. epidermidis	+	+	+	+	-
S. hominis	-	+	+	+	-
S. capitis	-	-	+	+	+
S. auricularis	-	-	-	-	+
S. haemolyticus	-	-	+	+	-

Infekce může snáze vzniknout u člověka, který je nosičem stafylokoka, např. na nosní sliznici. Spojitost byla prokázána u *S. haemolyticus* z pacienta s konjunktivitidou a karbunkulózou (Toshkova a kol., 1999). Problematická může být identifikace KNS, obzvláště odlišení původců infekce od kontaminace. K identifikaci se využívá hodnocení morfologie kolonií, testy rezistence k antibiotikům a biochemické testy na produkci enzymů a využívání cukrů, serologické testy a molekulární typizace.

Patogenita KNS je způsobená přítomností faktorů virulence, které jim umožňují adherovat na složky tkání, unikat imunitnímu systému a rozkládat makromolekuly hostitele. U KNS slouží faktory virulence především k adhezi na buňky a extracelulární matrix hostitelského makroorganizmu a chrání bakterii před jeho imunitním systémem, což svědčí o přizpůsobení KNS životu komenzála. Nejčastějším a nejlépe popsaným faktorem virulence je tvorba biofilmu, na které se podílí různé molekuly produkované bakterií.

Biofilm je shluk bakterií obalený extracelulární matrix, která je tvořena bakteriálními buňkami a skládá se z exopolysacharidů, proteinů, extracelulární DNA a teichoových kyselin (Arciola a kol., 2012). Biofilm je odolný vůči antibiotikům, dezinfekci, fagocytóze a jiným složkám imunity hostitele. Nejzastoupenější druhy stafylokoků mezi původci infekcí spojených s biofilmem jsou *S. aureus* a *S. epidermidis*, častý je také *S. haemolyticus* nebo *S. capitis*. Tvorba biofilmu bývá rozdělována do 4 stádií: 1. počáteční přichycení bakteriálních buněk, 2. agregace buněk a akumulace v několika vrstvách, 3. maturace biofilmu a 4. uvolnění buněk z biofilmu a tvorba nového biofilmu (Obr. 1). V první fázi se uplatňují nespecifické interakce a autolyziny, druhá fáze je zprostředkovaná povrchovými vazebnými proteiny a intercelulární adhezí.

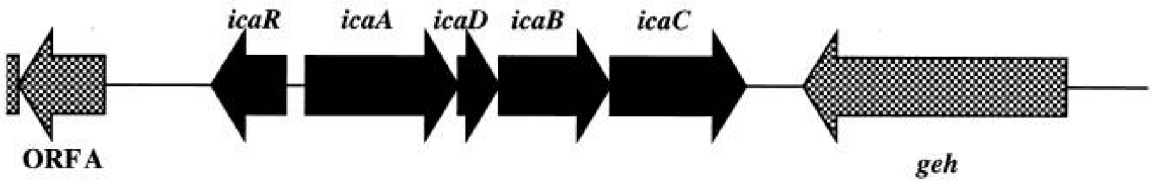
Obrázek 1. Fáze tvorby biofilmu (Arciola a kol., 2012; upraveno).



Biofilm bývá často spojen s produkcí polysacharidového intercelulárního adhezinu, který byl objeven u *S. epidermidis* a nachází se také u jiných KNS i u *S. aureus*. Biofilm může ovšem vznikat i bez tvorby adhezinu, pokud bakterie tvoří povrchový protein Bap. Tvorby biofilmu se účastní také protein Aap, teichoové kyseliny a extracelulární DNA, která přispívá k primárnímu přichycení a k akumulaci buněk a pochází pravděpodobně z lyzované subpopulace bakterií (Heilmann a kol., 2003).

Povrchový polysacharid se uplatňuje v kumulativní fázi tvorby biofilmu a umožňuje adhezi mezi buňkami (Mack a kol., 1996). Je to lineární homopolysacharid a pro jeho tvorbu jsou důležité produkty operonu *ica* (*icaADBC*), který se skládá ze čtyř ORF s regulačním genem *icaR* umístěným před nimi v opačné orientaci (Obr. 2; Cramton a kol., 2001). Produkty IcaA a IcaD tvoří oligomerní cukry z UDP-N-acetylglukozaminu a spolu s IcaC potom vytvářejí polysacharid (Gerke a kol., 1998). IcaB po exportu polysacharid upravuje (Vuong a kol., 2004a).

Obrázek 2. Uspořádání genů v lokusu *ica* (Cramton a kol., 2001).



Mezi další faktory virulence u KNS patří povrchové proteiny vázající komponenty extracelulární matrix, např. fibrinogen, fibronektin, vitronektin, kolagen a laminin. Mezi tyto proteiny patří také povrchový protein *S. saprophyticus*, umožňující adhezi na epitel močového traktu (Gatermannn a kol., 1992). Proteiny mohou mít i jiné funkce než je adheze, např. se mohou podílet na aglutinaci erytrocytů. KNS tvoří méně často také degradativní exoenzymy, které se uplatňují především v životě komenzála. Příkladem jsou proteázy a peptidázy, které mají význam v maturaci jiných faktorů a k degradaci složek tkání (Sugai a kol., 1997). Lipázy mají pravděpodobně význam pro přežívání v sekretech na kůži, které obsahují tukové složky, a pro zabránění fagocytózy (Sakinc a kol., 2005). Ureáza je významná především pro *S. saprophyticus*, který bez ureázového genu ztrácí virulenci (Gatermann a Marre, 1989).

KNS produkují také menší množství toxinů, mezi které patří moduliny rozpustné ve fenolu, krátké peptidy s hemolytickými a protizánětlivými účinky, které mají význam také pro tvorbu biofilmu (Vuong a kol., 2004b). *S. epidermidis* tvoří také enterotoxiny (Madhusoodanan a kol., 2011). Geny, které je kódují, získává pravděpodobně od *S. aureus*. Významným faktorem virulence je také pouzdro z polyglutamátu, které chrání bakterie před antimikrobiálními peptidy a fagocyty a umožňuje přežít vysokou salinitu prostředí (Kociánová a kol., 2005). Geny pro tvorbu pouzdra zřejmě pocházejí z *Bacillus anthracis*.

Léčba infekcí KNS může být komplikována rezistencí k antibiotikům, která je u KNS velmi rozšířená. Např. více než 80 % nozokomiálních izolátů je rezistentních k meticilinu a tyto kmeny bývají rezistentní i k většině ostatních antibiotik. Proti MRKNS se používá vankomycin, na který však také existuje rezistence (Palazzo a kol., 2005). KNS jsou často rezistentní i k těžkým kovům, například *S. epidermidis* má na plazmidu operon *mer*, který má význam pro redukci Hg^{2+} na kovovou rtuť (Yu a kol., 2014). Spolu s podobnými mikroorganizmy ho lze využívat pro bioremediaci, odstraňování biologického znečištění.

1.1.1 *Staphylococcus haemolyticus*

S. haemolyticus je grampozitivní kok velký 0,8 až 1,3 μm. Jeho kolonie mají průměr 4 až 9 mm a jsou převážně nepigmentované (Schleifer a Kloos, 1975). Nachází se na kůži axily, perinea a v inguinální oblasti a je to druhý nejčastější stafylokok v krvi (Tristan a kol., 2006). Kromě člověka se vyskytuje také u opic a domácích zvířat (Fischetti, 2006). Je nepohyblivý, nesporulující, fakultativně anaerobní, využívá glukózu, sacharózu, maltózu, trehalózu a glycerol (De Vos a kol., 2009). Vytváří acetoin, katalázu, lipázu a je schopný hemolýzy. Dobře roste v 10% NaCl.

S. haemolyticus může způsobovat lokalizované i systémové infekce, často asociované s umělými materiály v těle (Falcone a kol., 2006). Je původcem zánětu středního ucha (Takeuchi a kol., 2005), meningitidy, infekcí kůže a měkkých tkání, umělých kloubů, bakteriémie a vzácně i endokarditidy (Falcone a kol., 2007). Může být také příčinou septikémie, peritonitidy, UTI, infekcí ran, kostí a kloubů (Tristan a kol., 2006). Léčbu infekcí komplikuje silná rezistence k antibiotikům a schopnost tvořit biofilm (De Allori a kol., 2006).

Dobře prostudován je kmen JCSC1435, který obsahuje velké množství inzerčních sekvencí (Takeuchi a kol., 2005). Ty mohou být zodpovědné za časté přestavby genomu. Genom je tvořen kružnicovým chromozomem o velikosti 2,7 Mb a 3 plazmidy velkými 2,3 kb, 2,4 kb a 8,2 kb. Kmen obsahuje plazmidy, nesoucí geny rezistence k antibiotikům. Rezistence je způsobena také geny na integrovaných plazmidech a transpozonech. V genomu kmene se nacházejí také profágy.

Kvůli silné vrstvě peptidoglykanu na *S. haemolyticus* dobře působí antibiotika narušující syntézu buněčné stěny. Některé kmeny si ovšem vyvinuly rezistenci ke glykopeptidům jako teikoplanin a vankomycin tím, že mají v peptidových můstcích peptidoglykanu glycin místo serinu (Vignaroli a kol., 2006). *S. haemolyticus* je vysoce rezistentní k antibiotikům, kromě glykopeptidů také k meticilinu, gentamicinu a erytromycinu (Falcone a kol., 2007).

Z faktorů virulence jsou významné hemolyziny (Molnàr a kol., 1994), pouzdro z polyglutamové kyseliny (Takeuchi a kol., 2005) a gonokokální růstový inhibitor, který je funkčně podobný δ-lyzinu *S. aureus* a hemolyzinu *S. lugdunensis* (Tristan a kol., 2006),

usmrcuje *Neisseria gonorrhoeae* a lyzuje erytrocyty, především lidské a koňské (Watson a kol., 1988). Druh je také schopný produkovat enterotoxiny (Valle a kol., 1990).

1.1.2 *Staphylococcus sciuri*

S. sciuri je grampozitivní, oxidáza-pozitivní, koaguláza-negativní stafylokok, pojmenovaný podle veverky, u které se běžně vyskytuje na kůži (Kloos a kol., 1976). Využívá celobiózu, galaktózu, sacharózu a glycerol a redukuje nitráty. Je slabě rezistentní k novobiocinu. Koky mají průměr 0,7-1,2 µm, jsou nepohyblivé, nesporulující a vyskytují se jednotlivě, ve dvojicích nebo často v tetrádách. Obsah G+C v genomu je 35,3±0,4 %.

Poddruh *S. sciuri* subsp. *sciuri* tvoří velké kolonie, většinou pigmentované, okrouhlé, hladké, lesklé, s lehce zvlněným okrajem a starší s vyvýšeným středem. Roste anaerobně v tioglykolátu, produkuje kyselinu z galaktózy, sacharózy, glycerolu a často z melezitózy. Typový kmen poddruhu je ATCC 29062. *S. sciuri* subsp. *lentus* tvoří malé, nepigmentované kolonie, většinou neroste anaerobně v tioglykolátu a produkuje kyselinu ze sacharózy, často také z galaktózy, glycerolu, laktózy a rafinózy. Typový kmen je ATCC 29070.

Druh dobře roste v koncentraci NaCl do 10 %, *S. sciuri* subsp. *sciuri* rychleji než *S. sciuri* subsp. *lentus*. Je rezistentní k lysozymu a *S. sciuri* subsp. *sciuri* je často slabě rezistentní i k lyzostafinu. Typový poddruh je také slabě rezistentní k penicilinu.

S. sciuri se běžně vyskytuje na kůži a sliznicích domácích i divokých zvířat, v potravinách živočišného původu, ve vodě, v půdě a na rostlinách (Kloos, 1980). Může se vyskytovat také na těle člověka, v nosohltanu, na kůži a v urogenitálním traktu (Couto a kol., 2000). *S. sciuri* může také způsobovat mnohá onemocnění, např. endokarditidu (Hedin a Widerstrom, 1998).

Význam *S. sciuri* spočívá také v původu genu *mecA* způsobujícímu rezistenci k meticilinu. Homolog genu se vyskytuje u přirozených izolátů *S. sciuri*, což svědčí o vrozeném původu tohoto genu (Couto a kol., 1996). *S. sciuri* nese gen *pbpD*, blízký homolog genu *mecA*, který kóduje penicilin vázající protein 4 (Antignac a Thomasz, 2009).

Po přenesení genu do meticilin-citlivého kmene *S. aureus* vykazoval tento vlastnosti typické pro MRSA kmen COL. Gen *mecA* se tedy mohl vyvinout z genu *pbpD*.

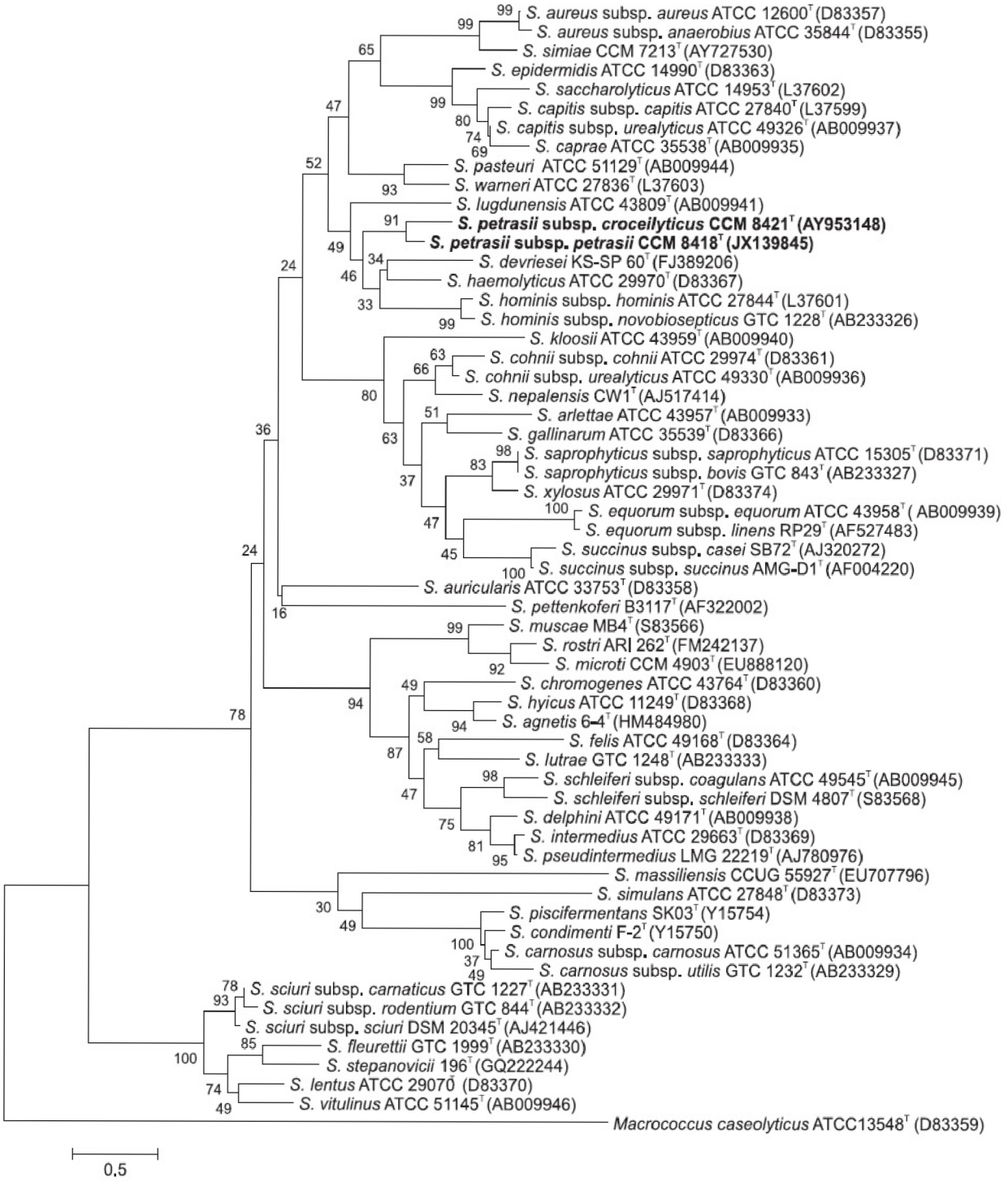
Druh byl izolován také v nemocničním prostředí, na nástrojích a různých površích (Dakić a kol., 2005). Většina izolátů, které patřily do poddruhů *S. sciuri* subsp. *sciuri*, *S. sciuri* subsp. *rodentium* a *S. sciuri* subsp. *carnaticus*, byla rezistentní alespoň k jednomu antibiotiku, některé byly i multirezistentní.

1.1.3 *Staphylococcus petrasii*

S. petrasii je oxidáza-negativních, novobiocin-citlivý koaguláza-negativní stafylokok, který byl izolovaný z lidských klinických vzorků a identifikován podle sekvenování (16S rRNA a genů *hsp60*, *rpoB*, *dnaJ*, *tuf* a *gap*), ribotypizace, PCR fingerprintingu a MALDI-TOF analýzy, metody hmotnostní spektrometrie (Pantůček a kol., 2013). Analýza sekvence 16S rRNA ukázala, že kmeny jsou příbuzné *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. devriesei* a *S. lugdunensis* (Obr. 3). Podle genotypových a fenotypových analýz byly izolované kmeny rozděleny do dvou poddruhů, *S. petrasii* subsp. *petrasii* a *S. petrasii* subsp. *croceilyticus*, s typovými kmeny CCM 8418^{T} a CCM 8421^{T}.

S. petrasii je pojmenován po českém mikrobiologovi Petru Petrášovi za jeho zásluhy pro taxonomii stafylokoků. Jeho buňky jsou grampozitivní koky, vyskytují se převážně ve dvojicích nebo ve shlucích, netvoří spory a jsou nepohyblivé. Kolonie jsou okrouhlé, hladké, konvexní, lesklé, s průměrem 2-4 mm a rostou aerobně. Druh má slabou hemolytickou aktivitu, roste v přítomnosti 10% NaCl, v 15 a 45 °C, ne však ve 12% NaCl a ve 4 °C. Produkuje katalázu, ureázu, pyrrolidonyl arylamidázu a arginin dihydrolázu. Má pozitivní test na acetoin, je citlivý na novobiocin, nehydrolyzuje eskulin, Tween 80 a želatinu. Produkuje kyselinu z glycerolu, D-glukózy, D-fruktózy, maltózy, sacharózy, trehalózy a slabě z D-turanózy a 5-keto-glukonátu.

Obrázek 3. Příbuznost *S. petrasii* s jinými druhy stafylokoků (Pantůček a kol., 2013).



S. petrasii subsp. *petrasii* má vlastnosti podobné popisu druhu, netvoří pigment na R2A agaru, je citlivý na lyzostafin, netvoří β-glukuronidázu, redukuje nitráty a má slabou DNázovou aktivitu. Produkuje kyselinu z D-manózy, některé kmeny také z ribózy, galaktózy,

laktózy, manitolu a škrobu. Může tvořit leucin arylamidázu. Typový kmen CCM 8418^T má obsah G+C v DNA 34,9 %, většina vlastností se shoduje s popisem poddruhu a produkuje kyselinu z ribózy, manitolu a škrobu. *S. petrasii* subsp. *croceilyticus* je nazván podle žlutých kolonií schopných rozkladu buněk hostitele. Charakteristická je pro něj krémově žlutá barva kolonií na R2A agaru, mírná rezistence k lyzostafinu, tvorba leucin arylamidázy a β-glukuronidázy. Tvoří kyselinu z D-arabinózy, ribózy a L-fukózy. Různé byly výsledky testů na tvorbu kyseliny z melezitózy, na chymotrypsin, α-glukozidázu a redukci nitrátů. Typový kmen CCM 8421^T má 35,5 % G+C, tvoří α-glukozidázu a redukuje nitráty.

V roce 2013 byl objeven nový poddruh *S. petrasii*, charakteristický pozitivní arginin dihydrolázou, negativní ornitin dekarboxylázou a neschopností tvořit anaerobně kyselinu z D-manózy, α-laktózy a turanózy (De Bel a kol., 2013). Kyselina je tvořena aerobně z trehalózy. Původně byl označen jako nový druh *S. jettensis* s typovým kmenem SEQ110^T (izolovaným z hemokultury v Jette v Belgii), později byla na základě DNA-DNA hybridizace, ribotypizace, PCR fingerprintingu založeném na repetitivních sekvencích, podle sekvence genů *dnaJ*, *tuf*, *gap*, *hsp60* a *rpoB* a podle biochemické charakterizace navržena jeho překlasifikace jako *S. petrasii* subsp. *jettensis* (De Bel a kol., 2014).

Je to grampozitivní kok vyskytující se jednotlivě, ve dvojicích nebo v nepravidelných shlucích, nepohyblivý, nesporulující. Velikost buněk se pohybuje mezi 0,5 a 1,5 mm. 2denní kolonie mají průměr 3-4 mm, jsou okrouhlé, hladké, vyvýšené, lesklé, s hladkými okraji. Po delší inkubaci tvoří žlutý pigment (kmen SEQ027 již po inkubaci přes noc). Tvoří úzkou zónu β-hemolýzy, je kapnofilní a fakultativně anaerobní. Tvoří katalázu, ale ne cytochrom oxidázu, je citlivý k novobiocinu, ureázu většinou netvoří. Aerobně tvoří kyselinu z D-glukózy, sacharózy, maltózy, trehalózy a β-D-fruktózy, redukuje nitráty a většina kmenů tvoří pyrrolidonyl arylamidázu. Některé kmeny jsou citlivé ke všem testovaným antibiotikům, jiné jsou rezistentní k penicilinu a většina je rezistentní k penicilinu, cefoxitinu, erytromycinu a klindamycinu. Vyskytuje se i rezistence k rifampicinu.

1.2 Rezistence k antibiotikům

Rezistence k antibiotikům může být způsobena několika základními mechanizmy: zabráněním průniku antibiotika do buňky, odstraněním antibiotika z buňky, inaktivací antibiotika chemickou modifikací, změnou cílové struktury antibiotika, alternativní metabolickou drahou nebo zvýšením produkce cílové látky (Willey, 2011). Geny kódující rezistenci jsou lokalizovány na bakteriálním chromozomu i na MGE. R-plazmidy (plazmidy navozující rezistenci) často nesou geny kódující enzymy uplatňující se v rezistenci, některé nesou pouze jeden gen rezistence, jiné více. Tyto geny jsou často součástí transpozonu.

1.2.1 Mechanizmy účinku antibiotik

Základními skupinami antibiotik jsou antibiotika bránící tvorbě buněčné stěny, antibiotika inhibující syntézu proteinů, dále ta, která brání syntéze nukleových kyselin, inhibují metabolické dráhy a rozrušují bakteriální membránu (Tenover, 2006; Tab. 2). Na tvorbu buněčné stěny působí β-laktamy a glykopeptidy. β-laktamy jsou např. peniciliny a cefalosporiny a interferují s enzymy potřebnými pro syntézu peptidoglykanu. Glykopeptidem je např. vankomycin, který se váže na koncový D-alanin vznikajícího peptidoglykanového řetězce a tím brání zesíťování.

Tabulka 2. Mechanizmy účinku antibiotik (Tenover, 2006; upraveno).

Mechanizmus	**Antimikrobiální látky**
Interference s tvorbou buněčné stěny	β-laktamy, glykopeptidy
Inhibice syntézy proteinů	makrolidy, chloramfenikol, tetracykliny, mupirocin
Interference se syntézou nukleových kyselin	fluorochinolony, rifampicin
Inhibice metabolických drah	sulfonamidy, analogy kyseliny listové
Narušení bakteriální membrány	polymyxiny, daptomycin

Syntézu bakteriálních proteinů inhibují antibiotika většinou vazbou na určité místo ribozomu (makrolidy a chloramfenikol vazbou na 50S podjednotku, tetracykliny na 30S podjednotku) nebo na bakteriální izoleucyl-tRNA-syntetázu (mupirocin). Selektivita těchto antibiotik je založena na rozdílech mezi bakteriálními a eukaryotickými ribozomy. Syntézu DNA inhibují např. fluorochinolony, RNA rifampicin. Fluorochinolony způsobují dvouřetězcové zlomy v DNA během replikace. Sulfonamidy a analogy kyseliny listové inhibují bakteriální metabolické dráhy. Bakteriální membránu narušují polymyxiny a daptomycin.

1.2.2 Mechanizmy rezistence k antibiotikům

Významným mechanizmem rezistence k antibiotikům je tvorba enzymů, které antibiotikum rozkládají. Tento mechanizmus se uplatňuje v rezistenci k β-laktamům. β-laktamázy se přirozeně vyskytují u některých bakterií, hydrolyzují β-laktamovou vazbu, charakteristickou pro β-laktamová antibiotika, a brání tak jejich funkci. Geny pro β-laktamázy se často nachází na plazmidech spolu s determinanty rezistence k jiné skupině antibiotik (Sirot a kol., 1987).

Dalším mechanizmem je získání genů pro metabolickou dráhu vedoucí ke změněné bakteriální buněčné stěně bez struktury, na kterou se antibiotikum váže (Tenover, 2006). Může se také snížit průnik antibiotika do buňky snížením tvorby porinů v membráně. Dále si může bakterie vytvořit efluxní pumpy, které odstraní antibiotikum před dosažením cílového místa. Efluxní systémy vedoucí k multirezistenci bývají kódované na chromozomu (Yoshida a kol., 1990). Specifické efluxní systémy bývají kódovány na MGE spolu s dalšími geny rezistence (Kehrenberg a kol., 1998).

Stafylokokové transportéry zvyšují rezistenci k velkému množství atimikrobiálních látek, např. makrolidům, chinolonům, tetracyklinům a streptograminům, stejně jako k širokému spektru biocidů, jako jsou kvartérní amoniové soli, biguanidiny a diamidiny (Hassan a kol., 2007). V nemocnicích si mohou KNS selekčním tlakem udržovat plazmidy s geny *qacA* a *qacC*, které způsobují aktivní transport antiseptik a dezinfekce z buňky (Leelaporn a kol., 1994). Geny kódující efluxní systémy také mohou přirozeně chránit

stafylokoky před imunitním systémem hostitele. Např. *S. aureus* má chromozomálně kódovaný protein Tet38, který slouží jako efluxní transportér, způsobuje rezistenci k tetracyklinu, ale přirozeně chrání bakterii před antimikrobiálními mastnými kyselinami na kůži a umožňuje tak její kolonizaci (Truong-Bolduc a kol., 2014).

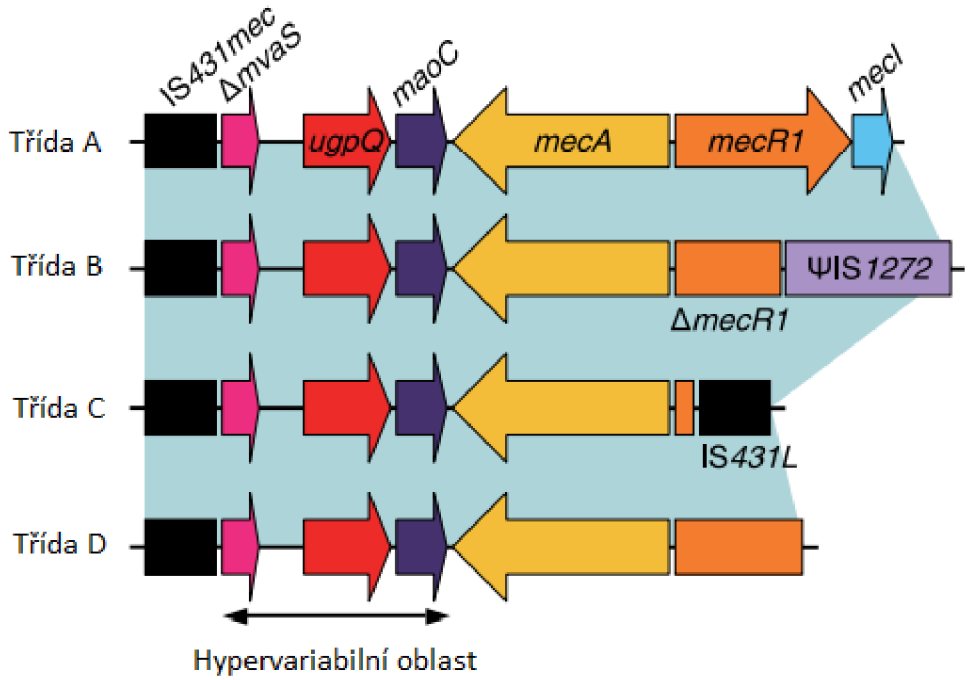
1.2.3 Rezistence k meticilinu

U stafylokoků je důležitá především rezistence k meticilinu. MRSA vzniká, když meticilin-citlivý *S. aureus* získá gen *mecA*, nesený elementem SCC*mec*. SCC*mec* je MGE, který se integruje do chromozomu blízko počátku replikace (Hanssen a kol., 2004). U KNS je rezistence k meticilinu výrazně častější než u *S. aureus*. Rezistentní KNS bývají méně patogenní, šíří ale tyto geny na *S. aureus*, který tak získává rezistenci (Moore a kol., 2003). Geny v SCC*mec* u různých izolátů z jedné oblasti jsou si více podobné než u MRSA nebo KNS z různých oblastí, což svědčí o horizontálním přenosu (Hanssen a kol., 2004).

Možným zdrojem genu *mecA* je *S. fleurettii* (Tsubakishita a kol., 2010). Gen se u něj nachází na chromozomu blízko esenciálních genů pro růst stafylokoků a není součástí SCC*mec*. Lokus *mecA* u *S. fleurettii* má prakticky identickou sekvenci s oblastí na SCC*mec* obsahující *mecA*. Také u *S. sciuri* a *S. vitulinus*, kteří mají společného předka se *S. fleurettii*, byl objeven homolog genu *mecA*, gen *mecA* tedy zřejmě pochází od tohoto předka. U některých kmenů *S. sciuri* a *S. vitulinus* byly nalezeny homology *mecA* s velkou podobností, nazvané *mecA1* a *mecA2* (Schnellmann a kol., 2006). Některé kmeny *S. aureus* mají homology s menší podobností, nazvané *mecB* (García-Álvarez a kol., 2011) a *mecC* (Shore a kol., 2011).

SCC*mec* nese genový komplex *mec* s genem *mecA*, který kóduje penicilin-vázající protein se sníženou afinitou k β-laktamovým antibiotikům, a genový komplex *ccr*, kódující místně specifickou rekombinázu pro excizi SCC*mec* a integraci na 3' konec genu *orfX* umístěného blízko počátku replikace *oriC* (Tsubakishita a kol., 2010). Genové komplexy *mec* se dělí do čtyř tříd (A, B, C a D) podle obsahu inzerčních sekvencí v genu *mecR1*. Všechny třídy obsahují IS*431mec* (IS*431R*). Genový komplex *mec* třídy A obsahuje geny v pořadí IS*431mec-mecA-mecR1-mecI* (Obr. 4), ostatní třídy jsou od něj pravděpodobně odvozené.

Obrázek 4. Struktura komplexu *mec* tříd A, B, C a D (Tsubakishita a kol., 2010; upraveno).



1.2.4 Rezistence k inhibitorům proteosyntézy

Další velmi významná rezistence u stafylokoků je rezistence k inhibitorům proteosyntézy (Schwarz a kol., 2011). Většina z nich způsobuje rezistenci k určité skupině těchto inhibitorů, některé ale vedou k multirezistentnímu fenotypu (rezistenci až k pěti typům inhibitorů proteosyntézy). Klíčovou roli v šíření této rezistence mezi stafylokoky hrají plazmidy, které primárně nesou některé geny rezistence. Plazmidy mohou být ale také vektory genů rezistence nesených na transpozonech. Velmi rozšířené jsou mezi stafylokoky lidského i zvířecího původu malé plazmidy nesoucí jeden gen rezistence k inhibitorům proteosyntézy. Různými mechanizmy mohou rekombinovat, integrovat se do chromozomální DNA nebo větších plazmidů.

Inhibitory proteosyntézy můžeme rozdělit do 4 skupin: 1) ty, které působí na 30S podjednotku ribozomu, 2) na 50S podjednotku, 3) na elongační faktory a 4) na izoleucyl-tRNA syntetázu. Na 30S podjednotku ribozomu se váží např. aminoglykozidy a tetracykliny. Na 50S podjednotku se váží amfenikoly, makrolidy, linkosamidy,

streptograminy, oxazolidinony a pleuromutiliny. Inhibitory elongačních faktorů zahrnují kyselinu fusidovou, která se u stafylokoků váže na elongační faktor G (EF-G) a inhibuje jeho uvolnění z komplexu s GDP. Inhibitory izoleucyl-tRNA syntetázy zahrnují mupirocin, který brání inkorporaci izoleucinu do vznikajícího polypeptidového řetězce.

Rezistence k tetracyklinům kódovaná plazmidem je nejčastěji způsobena geny *tetK* a *tetL* (Werckenthin a kol., 2001). Oba geny kódují efluxní proteiny spojené s membránou. Rezistence k makrolidům, linkosamidům a streptograminům nesená na plazmidu je způsobená množstvím genů, jejichž produkty modifikují cílové místo na ribozomu, aktivně transportují antibiotika nebo je inaktivují (Lina a kol., 1999). U stafylokoků je známo 6 typů genu *erm*: *A*, *B*, *C*, *T*, *Y* a *33* (Schwarz a kol., 2002), které kódují rRNA metylázy metylující 23S rRNA na překrývajícím se vazebném místě těchto antibiotik. Gen *msrA* kóduje protein, který transportuje makrolidy a streptogramin B z buňky (Ross a kol., 1990). Gen *lsaB* zase vede ke snížené citlivosti k linkosamidům (Kehrenberg a kol., 2004).

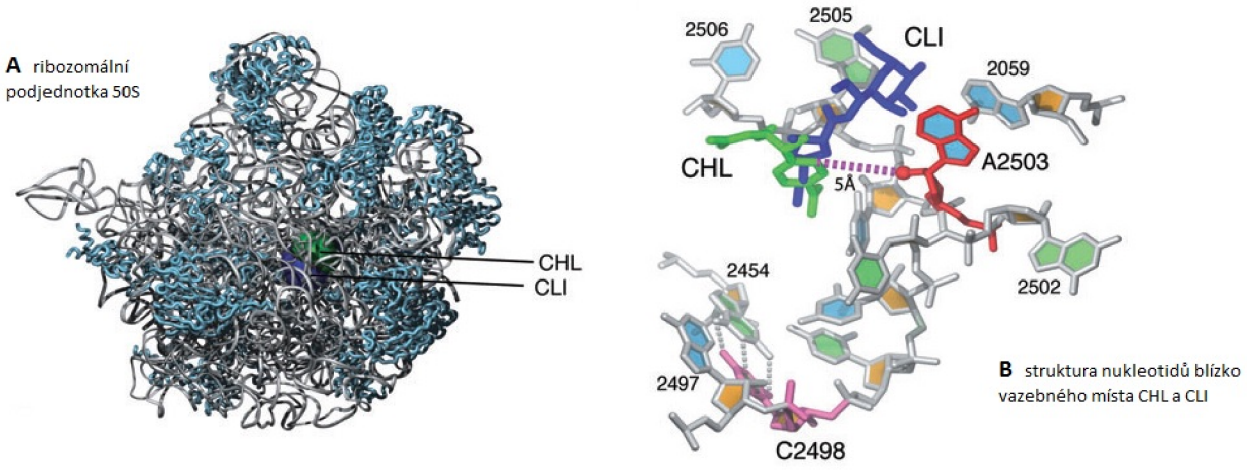
Produkty genů *vgaA*, *vgaB*, *vgaC* a *vgaE* transportují z buňky streptogramin A, některé však také linkosamidy a pleuromutiliny (Kadlec a Schwarz, 2009). Jiné geny kódují inaktivační ezymy: produkt genu *mphC* inaktivuje makrolidy (Hauschild a Schwarz, 2010), *lnuA* linkosamidy (Lüthje a kol., 2007), *vgbA* a *vgbB* streptogramin B (Allignet a kol., 1998), *vatA*, *vatB* a *vatC* zase streptogramin A. U kmenů styfylokoků zvířecího původu se stále častěji objevuje neobvyklý fenotyp LR/MS (rezistentní k linkosamidům a citlivé k makrolidům). Na plazmidech u nich byly nalezeny geny *lnuA* nebo *lnuB*, nepřítomné byly geny *erm* (Lozano a kol., 2012).

Gen *lnuA* může také zvyšovat rezistenci způsobenou genem *ermC* (Faccone a kol., 2014). Když byl přítomný jen gen *ermC*, rezistence ke klindamycinu i linkomycinu byla inducibilní, ne konstitutivní. Ovšem při přítomnosti genů *ermC* i *lnuA* byla inducibilní jen rezistence ke klindamycinu a MIC linkomycinu byla výrazně větší. Gen *lnuA*, který se nachází na malých plazmidech (2-4 kb), se zdá být častěji přítomen u KNS, které by tedy mohly být rezervoárem tohoto genu.

Rezistence k amfenikolům s geny na plazmidu je způsobena především chloramfenikol acetyltransferázami (Schwarz a kol., 2004). Kódují je geny *cat*, pojmenované podle plazmidů, na kterých byly poprvé nalezeny: cat_{pC221}, cat_{pC223} a cat_{pC194} (Brenner a Shaw, 1985). Produkt genu *fexA* je transmembránový přenašečový protein způsobující

rezistenci k chloramfenikolu i florfenikolu (Kehrenberg a Schwarz, 2004). Gen *cfr* kóduje rRNA metyltransferázu, která metyluje 23S rRNA ribozomu a na jiném místě ribozomu metylaci inhibuje (Kehrenberg a kol., 2005; Obr. 5), čímž způsobuje rezistenci k amfenikolům, linkosamidy, oxazolidinony, pleuromutiliny a streptogramin A (Long a kol., 2006).

Obrázek 5. Vazebná místa chloramfenikolu a klindamycinu na ribozomu (Kehrenberg a kol., 2005; upraveno).



Původně byl gen *cfr* identifikován na plazmidu pSCFS1 z bovinního izolátu *S. sciuri*, později byl identifikován u 8 různých G+ i G- bakteriálních druhů, nejčastěji u KNS (He a kol., 2014). Gen byl nalezen na různých plazmidech (o velikosti 35 až 50 kb, např. pSCFS1, pSCFS3, pSCFS6, pBS-01, pSS-01, pSS-02, pSS-03, pSS-04 a pJP2) a také na chromozomu (u *S. lentus*, gen byl ohraničen IS). Oblasti chromozomu s genem *cfr* mohou být přenášeny rekombinací zprostředkovanou IS elementy. Také na plazmidech s genem *cfr* byly nalezeny IS elementy (IS21-558, IS256, IS257, IS1216E), stejně jako další geny rezistence (*aadD*, způsobující rezistenci k aminoglykozidům, *ble* k bleomycinu, *ermB* a *ermC* k makrolidům, linkosamidům a streptograminu B). IS tedy hrají významnou roli v šíření genu *cfr*, mezi plazmidy i z plazmidu na chromozom. Gen *cfr* také může ležet blízko genu *fexA* pro rezistenci k amfenikolům (u některých KNS se nacházejí na jednom plazmidu) a může tak docházet ke koselekci (Kadlec a kol., 2012).

Rezistence způsobená genem *cfr* se může kombinovat s dalšími rezistencemi. Kmen 426-3147L *S. epidermidis* (klinický izolát) má velmi vysoký stupeň rezistence k linezolidu díky kombinaci mechanizmů (LaMarre a kol., 2013). Gen *cfr* produkuje Cfr metyltransferázu, která modifikuje 23S rRNA v peptidyltransferázovém centru ribozomu, na které se váže linezolid. Gen je spojen s nízkou rezistencí na linezolid, u tohoto kmene se však nachází na plazmidu p7LC, který má více kopií, tvoří se tedy větší množství produktu. Gen se navíc nachází v blízkosti transpozonu, od kterého se gen také přepisuje. Na plazmidu byly také nalezeny geny *ermB* a *aacA-aphD*, kvůli kterým je kmen rezistentní ke všem významným antibiotikům působícím na velkou podjednotku ribozomu (makrolidům, linkosamidům, pleuromutilinům, amfenikolům, oxazolidinonům a streptograminům) a aminoglykozidům působící na malou podjednotku. Slabší rezistence k linezolidu však u kmene zůstala i po eliminaci plazmidu, a to kvůli mutacím v genech pro rRNA a ribozomální proteiny L3 a L4.

Kombinace mechanizmů rezistence k linezolidu se vyskytuje i u *S. haemolyticus* (Tewhey a kol., 2014). U izolátu *S. epidermidis* a *S. haemolyticus* z krve byly detekovány mutace v genech pro ribozomální proteiny L3 a L4, mutace v 23S rDNA a téměř u poloviny izolátů *S. epidermidis* byla nalezena také Cfr metyláza, kódovaná na 17kb plazmidu podobném pSCFS1 a na malém asi 3kb plazmidu podobném plazmidu s *cfr* u *S. cohnii*. Izoláty se stejným sekvenčním typem měly jedinečné mutace spojené s rezistencí k linezolidu, což svědčí o nezávislém získání rezistence u jednotlivých izolátů. Izoláty s větším množstvím mechanizmů byly více rezistentní, což potvrzuje, že různé mechanizmy rezistence k linezolidu se sčítají. U *S. haemolyticus* byl detekován také gen pro Cfr metylázu (Rajan a kol., 2014).

Gen *aacA-aphD* kóduje enzym způsobující rezstenci k aminoglykozidům gentamicinu, kanamycinu, tobramycinu a při nadprodukci také k amikacinu (Torres García a kol., 1996), gen *aadD* kóduje enzym vedoucí k rezistenci ke kanamycinu, neomycinu a tobramycinu (McKenzie a kol., 1987), geny *aadE* a *str* zase enzymy způsobující rezistenci k streptomycinu (Projan a kol., 1988). Rezistence k spektinomycinu je způsobena genem *spc*, nebo také *aad9* (Murphy, 1985). Gen *apmA* kóduje enzym, který snižuje citlivost k apramycinu a gentamicinu (Fessler a kol., 2011).

Kyselina fusidová je antibiotikum používané na kožní stafylokokové infekce (Yazdankhah a kol., 2006). Inhibuje syntézu proteinů interferencí s elongačním faktorem,

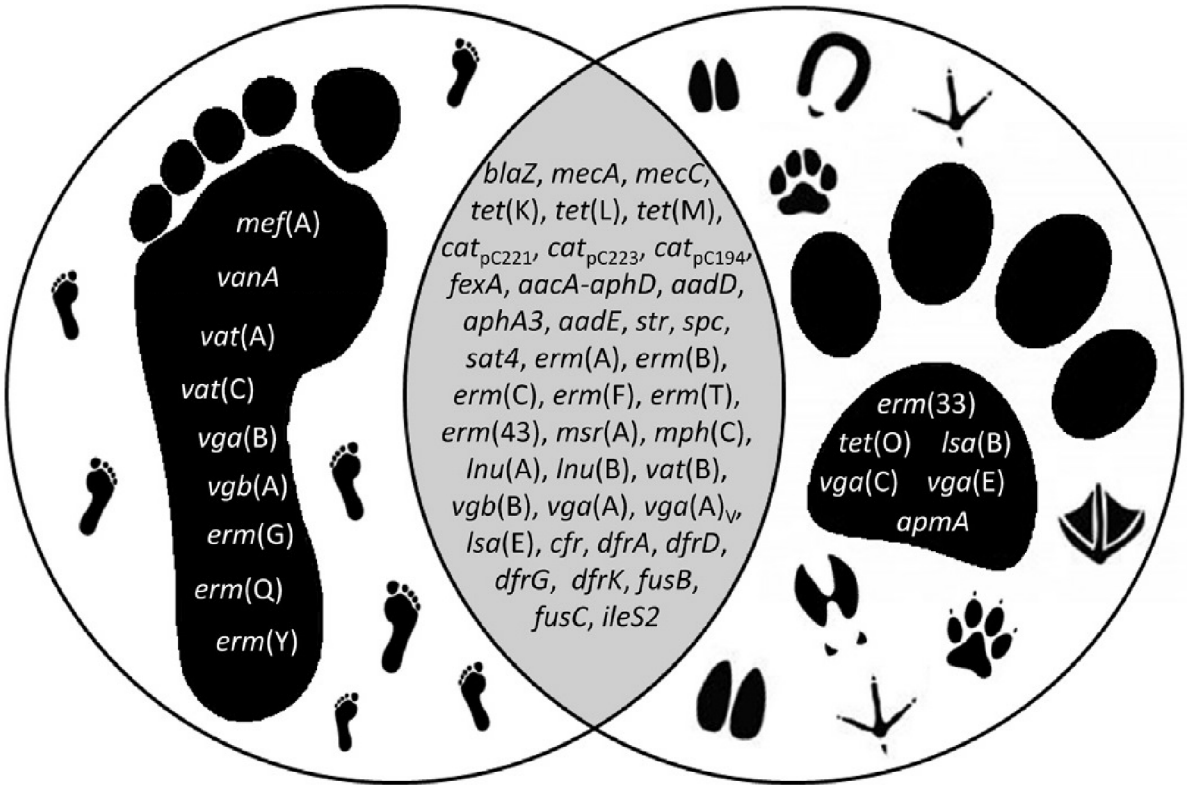
EF-G. Rezistence k fusidové kyselině je u stafylokoků způsobena hlavně dvěma mechanizmy: sníženou afinitou proteosystetického aparátu k fusidové kyselině (způsobenou bodovými mutacemi v chromozomálním genu *fusA* kódujícím elongační faktor EF-G) a sníženou permeabilitou (která se zdá být spojená s plazmidem, který nese gen *fusB* kódující protein způsobující snížení permeability membrány). Další gen rezistence k fusidové kyselině nacházející se na plazmidu je *fusC* (O'Neill a kol., 2007).

Mupirocin je antibiotikum produkované *Pseudomonas fluorescens*, které inhibuje syntézu proteinů kompetitivní inhibicí bakteriální izoleucyl-tRNA syntetázy. Je jedním z nemnohých antibiotik použitelných na kmeny MRSA a MRKNS a používá se na léčbu různých kožních infekcí, stejně jako na eradikaci nosičství MRSA na nosní sliznici (Do Carmo Ferreira a kol., 2011; Kresken a kol., 2004). Rezistence k mupirocinu způsobená plazmidem je založena na přítomnosti izoleucyl-tRNA syntetázy necitlivé na mupirocin, kódované genem *ileS*, známým také jao *ileS2* nebo *mupA* (Needham a kol., 1994). Slabou rezistenci k mupirocinu způsobuje změna izoleucyl-tRNA syntetázy, silnou získání nové syntetázy, kódované genem *mupA* (Kresken a kol., 2004). Častější je rezistence slabá, více u KNS než *S. aureus*, většina rezistentních kmenů je rezistentní také k meticilinu.

1.2.5 Rezistence k antibiotikům v různých prostředích

U KNS zvířat byly objeveny rezistence ke všem třídám antibiotik, které se používají u zvířat – penicilinům, cefalosporinům, tetracyklinům, makrolidům, linkosamidům, amfenikolům, aminoglykosidům, aminocyklitolům, pleuromutilinům a diaminopyrimidinům (Wendlandt a kol., 2013). Většina genů rezistence u stafylokoků zvířat je společná s geny u lidí, např. geny *blaZ* nebo *mecA* pro rezistenci k β-laktamům, jiné jsou geny *tet*, *erm*, *vga*, *vgb*, *lsa*, *cfr* a *cat* způsobující rezistenci k inhibitorům proteosyntézy. Pouze u lidských KNS byly nalezeny geny *vanA* pro rezistenci k vankomycinu a *mefA*, *vatA*, *vatC*, *vgaB*, *vgbA*, *ermG*, *ermQ* a *ermY* pro rezistenci k inhibitorům proteosyntézy, pouze u zvířecích *erm33*, *tetO*, *vgaC*, *vgaE*, *lsaB* a *ampA*, které také způsobují rezistenci k inhibitorům proteosyntézy (Obr. 6).

Obrázek 6. Geny rezistence k antibiotikům lidí a zvířat (Wendlandt a kol., 2013; upraveno).



U zvířat s mastitidou je u stafylokoků nečastější rezistence k penicilinu a ampicilinu, protože jsou to nejčastěji používaná antibiotika na léčbu mastitid (Ergün a kol., 2012). Rezistence je způsobená produkcí β-laktamázy, kódovanou genem *blaZ*. Druhá nejčastější je zde rezistence k tetracyklinům, které jsou druhou nejčastěji používanou skupinou antibiotik na mastitidy. U krav se subklinickou mastitidou bylo také nalezeno mnoho izolátů rezistentních k meticilinu (Inegol a Turkyilmaz, 2012). Nejčastěji měly v chromozomu SCC*mec* typů II a III, méně IV a vzácně V.

U psů se také často vyskytují rezistentní stafylokoky. Na nosní sliznici psů převažují KNS a *S. pseudintermedius* (Wedley a kol., 2014; Hauschild a Wójcik, 2007). Většina izolátů byla rezistentní alespoň k jednomu antibiotiku (nejčastěji k penicilinům, cefalosporinům, fusidové kyselině, tetracyklinům, erytromycinu a klindamycinu). Častější byla rezistence u KNS než u koaguláza-pozitivních izolátů. Některé KNS byly rezistentní i k meticilinu a většina těchto kmenů byla multirezistentní.

U *S. sciuri* z prasat byly nalezeny plazmidy nesoucí geny pro rezistenci k tetracyklinům *tetK* a *tetL* (Schwarz a Noble, 1994), izoláty z dobytka a koní měly zase rezistenci k chloramfenikolu (Schwarz a kol., 1990), streptomycinu (Schwarz a Grölz-Krug, 1991), florfenikolu (Schwarz a kol., 2000), erytromycinu a spektinomycinu (Schwarz a kol., 2002). Některé klinické izoláty byly multirezistentní. Rezistence u *S. sciuri* některých divoce žijících zvířat byla také vysoká (Couto a kol., 2000), u hlodavců a hmyzožravců byla ale málo častá, zřejmě kvůli malému kontaktu těchto zvířat s antibiotiky (Hauschild a Schwarz, 2003).

Na farmách byly detekovány stafylokoky s genem *cfr* u prasat, kuřat a kachen (Wang a kol., 2013). Výskyt koreloval s užíváním antibiotik na farmách. Přítomnost genu je pro nosiče málo nevýhodná, proto gen přetrvává i v prostředí bez antibiotika. Gen se nacházel u *S. lentus*, *S. sciuri* a *S. haemolyticus*. Na plazmidech s genem *cfr* se nacházely také další geny rezistence, proto docházelo ke koselekci v prostředí s makrolidy a aminoglykozidy.

Také u stafylokoků v potravinách byla detekována rezistence k antibiotikům. Nejčastější izolátem v mase a sýrech je *S. xylosus*, v sýrech se vyskytují také *S. lentus*, *S. caprae*, *S. epidemidis* a *S. haemolyticus,* v sýrech, uzeninách a salátech se nachází i *S. aureus* a *S. saprophyticus* (Perreten a kol., 1998; Chajecka-Wierzchowska a kol., 2014). Většina izolátů je rezistentní alespoň k jedné třídě antibiotik, vzácná není ani multirezistence. Často nacházená je rezistence k chloramfenikolu, tetracyklinu, erytromycinu, linkomycinu, cefoxitinu, klindamycinu, tigecyklinu, quinupristinu-dalfopristinu a rifampicinu. Všechny izolované MRKNS nesly gen *mecA*, kmeny rezistentní k tetracyklinu nesly geny *tetK*, *tetL* a *tetM*. Kmeny rezistentní k erytromycinu obsahovaly hlavně geny *ermA* a *ermC*, *ermB* je u stafylokoků méně častý. U některých kmenů se vyskytoval také gen *msr* pro eflux erytromycinu. Gen *linA* způsoboval rezistenci k linkomycinu a klindamycinu, gen *cat* zase k chloramfenikolu.

KNS izolované ze znečištěné vody byly často rezistentní k tetracyklinu a chloramfenikolu, méně často k erytromycinu, neomycinu a streptomycinu (Kessie a kol., 1998). Rezistestentní stafylokoky byly nalezeny také ve vesmírné stanici a výzkumné stanici na Antarktidě (Schiwon a kol., 2013). Uzavřené prostředí s extrémními podmínkami zde vedlo ke zvýšené výměně genů mezi bakteriemi, které sem byly zataženy lidmi jako součást přirozené mikroflóry. Většina bakterií zde také tvořila biofilm.

Rezistence k antibiotikům byla zjištěna i u KNS kolonizujících lidské střevo (Vitali a kol., 2014). Izoláty z čerstvé stolice zdravých lidí v Nigérii byly podrobeny testům rezistence a PCR. Kmeny rezistentní ke gentamicinu nesly gen *aac–aph*, kmeny rezistentní k erytromycinu *ermC*, méně *msrA*. Tetracyklin-rezistentní izoláty nesly gen *tetK* a méně *tetM*. Tyto kmeny mohou být rezervoárem pro šíření genů rezistence na *S. aureus* ve střevě.

V nemocničním prostředí bývají často nacházené rezistentní stafylokoky. Nejčastěji se u pacientů vyskytuje *S. epidermidis*, dále také *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. xylosus*, *S. warneri* a *S. capitis* (Koura a kol., 2007). Většina izolátů je rezistentní k penicilinům, mnoho kmenů produkuje β-laktamázy. Některé kmeny bývají rezistentní k chloramfenikolu, gentamicinu, některé k cefalosporinům a tetracyklinu. V testovaných krevních kulturách na jednotce intenzivní péče měly KNS z bakterií největší zastoupení (Wattal a kol., 2014). Často byla detekována rezistence k penicilinu, možnými léky pro empirickou terapii jsou vankomycin, linezolid a tigecyklin. U KNS byla častá také rezistence k oxacilinu, klindamycinu a gentamicinu.

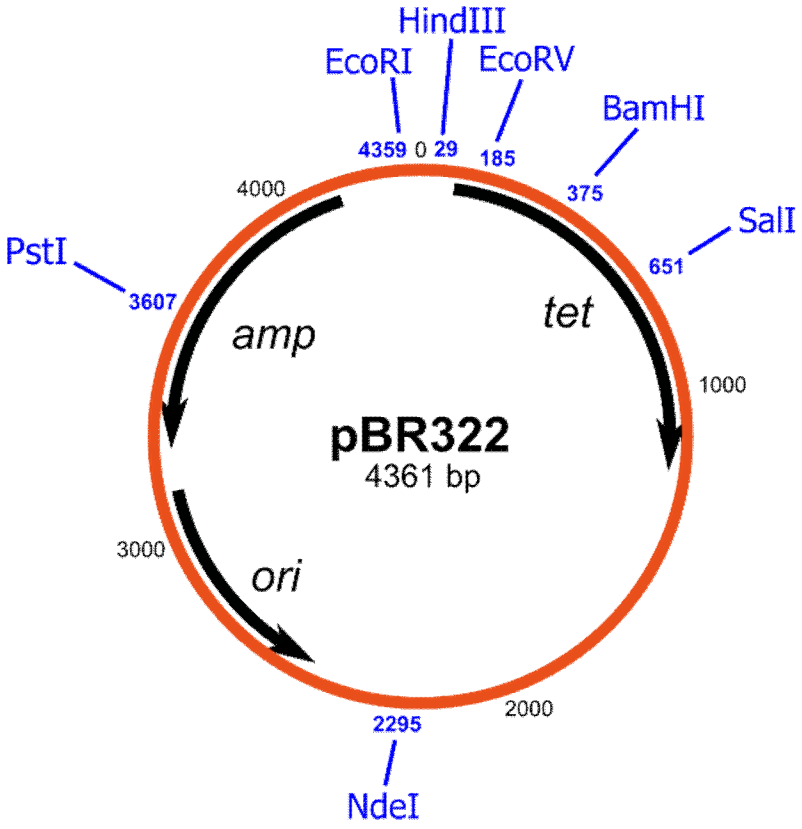
1.3 Horizontální přenos genů

Geny rezistence k antibiotikům se mohou přenášet mezi různými kmeny a druhy bakterií díky tomu, že se nachází na MGE, především na plazmidech. Plazmidy jsou molekuly většinou cirkulární DNA nutné pro konjugaci, tedy výměnu plazmidové DNA mezi buňkami (Willey, 2011). Jsou nezávislé na chromozomu, mají vlastní replikační počátky a autonomní replikaci. Na plazmidech bývá malé množství genů, většinou pod 30, a neobsahují nepostradatelnou genetickou informaci. Často ale umožňují bakteriím rezistenci.

Plazmidy podmiňující rezistenci k antibiotikům (R-plazmidy či R-faktory) nesou geny kódující enzymy schopné zničit nebo modifikovat antibiotika (Obr. 7). Většinou se neintegrují do chromozomu. Jsou zde např. geny kódující rezistenci k ampicilinu, chloramfenikolu a kanamycinu. Některé R-plazmidy nesou pouze jeden gen rezistence, jiné až 8. Tyto geny jsou často v transpozonu (proto snadno vznikají multirezistentní plazmidy) a mnohé R-plazmidy jsou také konjugativní a mohou se šířit v populaci. Ovšem i nekonjugativní plazmidy se přenáší mezi bakteriemi – a to při konjugaci vyvolané jinými

plazmidy. Takové plazmidy jsou nazývány mobilizovatelné. Některé plazmidy jsou přenášeny i mezidruhově – např. *E. coli* je při použití antibiotika selektována, rozšíří se a přenáší geny do patogennějších bakterií rodů *Salmonella* a *Shigella*.

Obrázek 7. Struktura R-plazmidu (Slonczewski a Foster, 2010).



Šipkami je označen počátek replikace a geny rezistence k ampicilinu a tetracyklinu, modře jsou označena místa štěpení restrikčními endonukleázami.

Plazmidy mají význam pro diverzitu a evoluci bakterií a využívají se jako vektory v genovém inženýrství. DNA plazmidů je dvouřetězcová, jejich délka se pohybuje mezi 1 a 1000 kb. V buňce mohou být přítomné v různém počtu kopií (jeden až stovky). Mnoho plazmidů je kryptických (nemají známou funkci). Kromě genů rezistence mohou nést také geny virulence nebo geny pro tvorbu bakteriocinů, antimikrobiálních proteinů tvořených

bakteriemi, které mohou obsahovat neobvyklé aminokyseliny s tioéterovými můstky (Schnell a kol., 1988). V jedné buňce se mohou nacházet jen plazmidy, které jsou kompatibilní (mají odlišný mechanizmus replikace).

Přítomnost plazmidu v buňce se prokazuje izolací plazmidové DNA s následnou elektroforézou, elektronovou mikroskopií nebo centrifugací. Při ztrátě plazmidu dochází ke ztrátě fenotypových vlastností kódovaných na plazmidu (Lacey, 1975). Plazmidy je možné z buňky odstranit pomocí interkalačních barviv, jako je etidium bromid, a některými antibiotiky, které brání replikaci kružnicové DNA (novobiocin) nebo transkripci (rifampicin). SDS narušuje vazbu plazmidů k membráně, účinná pro „plasmid curing“ je také zvýšená teplota kultivace nebo skladování bakteriální kultury.

1.3.1 Plazmidy u stafylokoků

Plazmidy stafylokoků se rozdělují do skupin podle mechanizmu replikace a schopnosti konjugace. Malé plazmidy do 5 kb se replikují mechanizmem otáčející se kružnice, větší se replikují theta replikací a dělí se na konjugativní plazmidy podobné pSK41 a nekonjugativní plazmidy nesoucí geny rezistence k antibiotikům a těžkým kovům (Shearer a kol., 2011). Malé plazmidy často nesou jen jeden gen rezistence přenášený transdukujícími fágy, mobilizovaný konjugativními plazmidy nebo spojený s konjugativními nebo mobilizovatelnými plazmidy replikativní transpozicí pomocí IS*257* nebo homologní rekombinací mezi IS*257* elementy. Větší nekonjugativní plazmidy mohou být také přeneseny mobilizací nebo transdukcí.

1.3.2 Plazmidy s geny rezistence k inhibitorům proteosyntézy

U stafylokoků bylo identifikováno mnoho plazmidů s geny rezistence k jednomu nebo několika antibiotikům inhibujícím proteosyntézu. Nacházely se převážně na nekonjugativních plazmidech do 10 kb. Z genů rezistence k tetracyklinům je mezi staflokoky nejrozšířenější *tetK*. Často se nachází na strukturně podobných plazmidech o velikosti kolem 4,5 kb

(Schwarz a kol., 1998), které připomínají prototypový plazmid pT181 z *S. aureus*. Plazmidy podobné pT181 byly izolovány např. u *S. cohnii*, *S. epidermidis*, *S. equorum*, *S. haemolyticus*, *S. saprophyticus*, *S. sciuri*, *S. warneri* a *S. xylosus*. Méně rozšířený je gen *tetL* nalezený u *S. epidermidis*, *S. lentus*, *S. sciuri* a *S. xylosus* zvířecího původu (Schwarz a Noble, 1994), který se nachází hlavně na plazmidech o velikosti 4,3 až 7,5 kb. U mnoha stafylokoků lidského i zvířecího původu byly nalezeny plazmidy o velikosti 2,3-4 kb, které nesou gen *ermC* pro rRNA metylázu (Werckenthin a kol., 2001). Plazmidy nesoucí gen *lnuA* kódující linkosamid nukleotidyltransferázu byl identifikován u *S. aureus* a KNS, jako jsou *S. chromogenes*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus* a *S. simulans*, izolovaných od krav s mastitidou (Lüthje a kol., 2007). Plazmidy měly velikost 2,3 a 3,8 kb.

Plazmid pIP1714 velký 5 kb z *S. cohnii* nesl geny rezistence *vgbB* a *vatC*, způsobující rezistenci k streptograminu B a A (Allignet a kol., 1998). Gen *cat* pro rezistenci k chloramfenikolu byl nalezen na plazmidech pC221, pC223 a pC194 u stafylokoků (Schwarz a kol., 2004). Plazmid pC221 má velikost 4,5 kb a jemu podobné plazmidy velké 2,9-4,6 kb byly nalezen u stafylokoků zvířecího původu (Cardoso a Schwarz, 1992). Plazmid pC223 má 4,6 kb, další plazmidy od stafylokoků jsou mu velmi podobné, méně pak 3,7kb plazmid pSCS5 z *S. haemolyticus*, izolovaného ze psa (Schwarz a Cardoso, 1991). Plazmidy pC221 a pC223 jsou časté u zvířecích stafylokoků. Plazmid pC194 má 2,9 kb a u stafylokoků byl nalezen jen jeden jemu podobný plazmid, pSCS34, z *S. sciuri* zvířecího původu (Hauschild a kol., 2009). Gen *cfr* způsobující multirezistenci byl identifikován na plazmidech KNS ze zvířat (Kehrenberg a kol., 2004), později také u dalších druhů.

Gen *cfr* se většinou nachází na plazmidu, může být ale také umístěn na chromozomu. Byly zkoumány 4 lidské MRKNS (*S. haemolyticus* a *S. cohnii*), které byly rezistentní k linezolidu a nesly gen *cfr* na plazmidu o velikosti 35,4 kb (Cui a kol., 2013). Plazmid byl nerozlišitelný od plazmidu pSS-02 nesoucího gen *cfr*, který pochází z prasečích stafylokoků, dá se tedy, že je možný přenos tohoto plazmidu mezi prasečími a lidskými stafylokoky. Gen byl identický s genem *cfr* z pSCFS1 *S. sciuri*, pSS-01 *S. cohnii*, pSS-02 *S. saprophyticus*, pSCFS6 *S. warneri* a pSCFS7 *S. aureus* (MRSA). Velmi podobný byl také genu *cfr* z pSCFS3 *S. aureus*.

Ve studii Li a kol. obsahovaly *S. cohnii* a *S. simulans* rezistentní k pleuromutilinům plazmid velký 6 kb (pSA-7) s variantou genu *vgaE*, který kóduje ABC protein (2014).

Varianta proteinu VgaE způsobovala zkříženou rezistenci k pleuromutilinům, linkosamidům a streptograminu A. Organizace plazmidu pSA-7 byla podobná plazmidu pKKS49 nesoucímu gen *apmA* z MRSA a plazmidu pKKS966 nesoucímu gen *dfrK* z *S. hyicus*. Získání genu tedy mohlo být spojeno s rekombinací, kterou by se mohl šířit na další stafylokoky i jiné bakterie.

1.3.3 Rezistence k antibiotikům spojená s velkými plazmidy

Velké plazmidy u stafylokoků často nesou geny rezistence k antibiotikům. Ve studii Shearerové a kol. byly sekvenovány izoláty z různých míst světa během 60 let a u většiny (79 %) byl nalezen alespoň jeden plazmid nad 20 kb (2011). Většina z nich (75 %) měla velikost 20-30 kb. Téměř polovina byla zařazena do 3 velkých rodin podle restrikčního štěpení. To ukazuje, že jsou velké multirezistentní plazmidy konzervované a šíří se mezi kontinenty. Plazmidy měly velikost od 1,3 kb do 64,9 kb, nesly mnoho genů rezistence k antibiotikům a také geny virulence, geny rezistence ke kovům a geny pro transponázy a rekombinázy. Plazmidy v rámci rodiny si byly hodně podobné (98% identita, jen inzerce a delece) navzdory časové a místní vzdálenosti, velký selekční tlak tedy optimalizoval obsah plazmidů přes jejich velikost a komplexní organizaci. Geny rezistence nesené na těchto velkých plazmidech byly geny pro β-laktamázy, geny rezistence k makrolidům, aminoglykozidům a bacitracinu a také geny pro multirezistentní efluxní proteiny.

Mnoho stafylokokových plazmidů velkých >10 kb nesou jeden nebo více genů rezistence k inhibitorům proteosyntézy, často v kombinaci s geny rezistence k jiným antibiotikům (Schwarz a kol., 2011). Geny rezistence k inhibitorům proteosyntézy získaly plazmidy intergrací transpozonů. Mezi tyto velké plazmidy patří např. pSTS20 z *S. haemolyticus* s geny *aacA-aphD*, v transpozonu Tn*4001*, a *tetK*, z pT181 integrovaného prostřednictvím IS*257*, pSCFS1 z *S. sciuri* s geny *cfr*, *lsaB*, *erm33* a *spc* a pSERP z *S. epidermidis* s geny *aphA-3*, *sat* a *aadE,* který se opět nachází v transpozonu – v tomto případě Tn*5405*.

1.3.4 R-plazmidy u stafylokoků z různých prostředí

Ze znečištěné vody byly izolovány kmeny *S. simulans, S. lenticus, S. hyicus* a *S. xylosus* (Kessie a kol., 1998). *S. simulans* a *S. xylosus* jsou spojovány především s infekcemi člověka, *S. hyicus* a *S. lenticus* jsou méně časté oportunní patogeny (Kloos a kol., 1981). Izoláty obsahovaly převážně malé plazmidy, velké 2 až 4,7 kb (Kessie a kol., 1998). Kmeny *S. simulans* obsahovaly 1 až 4 malé plazmidy (3,2 až 4,7 kb) a 1 velký plazmid, jeden kmen neobsahoval plazmidy žádné. Izoláty *S. lenticus* nesly 1 až 4 malé plazmidy (2 až 4,4 kb) a 1 velký. Izolát *S. hyicus* měl až 7 malých plazmidů (2 až 4,7 kb) a velký plazmid. Izolát *S. xylosus* obsahoval 3 malé plazmidy (2 až 4,4 kb) a opět 1 velký.

Většina kmenů obsahovala plazmidy s geny rezistence k chloramfenikolu, druhá nejčastější byla rezistence k tetracyklinu, méně časté byly malé plazmidy nesoucí geny rezistence k erytromycinu, neomycinu a streptomycinu. Většina genů rezistence se nacházela na malých plazmidech (2 až 4,7 kb), geny pro rezistenci k chloramfenikolu se nacházely i na plazmidech s velkou molekulovou hmotností. Rezistence k tetracyklinu byla vždy na 4,3kb plazmidu, rezistence k neomycinu na 4,4kb plazmidu, rezistence k streptomycinu na 4,7kb plazmidu a rezistence k erytromycinu na 2,3kb plazmidu. Výsledky naznačují, že by multirezistentní KNS ve znečištěné vodě mohly být rezervoárem genů rezistence pro společnost.

R-plazmidy bývají často nacházeny také u zvířat. Malý plazmid o velikosti 4,4 kb kódující rezistenci k streptomycinu byl nalezen u multirezistentního *S. hyicus* izolovaného ze selete s exudativní epidermitidou a nazván pSAI-1 (Schwarz a kol., 1990). Struktura plazmidu byla podobná plazmidu pSK68 z *S. aureus* lidského původu, který také nese gen rezistence k streptomycinu. Tyto výsledky naznačují výměnu genů rezistence mezi druhy. MIC streptomycinu u kmene s pSAI-1 byla asi 10× vyšší než u *S. aureus* s plazmidy nesoucími geny rezistence k streptomycinu.

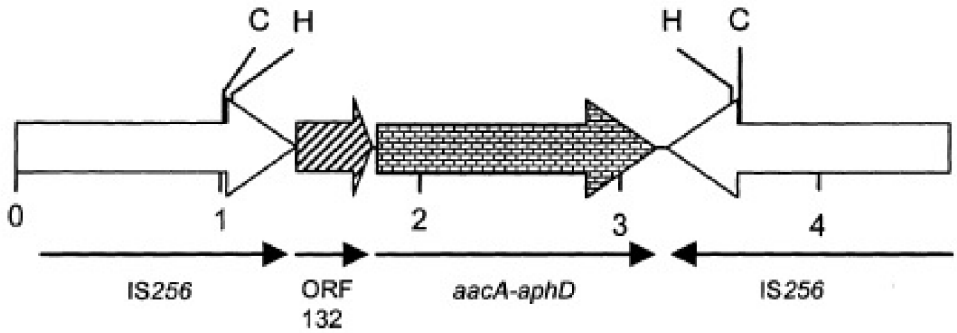
Sidhu a kol. zjišťovali rezistenci k antibiotikům u kmenů *S. haemolyticus* izolovaných na zvířecí klinice (2007). Nalezené multirezistentní druhy měly všechny v chromozomu gen *mecA*, dále 45kb plazmid s geny *blaZ* a *qacA/B* a všechny kromě jednoho měly více menších plazmidů (o velikosti 1-22 kb) s geny rezistence k tetracyklinům, makrolidům a chloramfenikolu. Gen *tetK* se nacházel na 4,5kb plazmidu, gen *cat* na 3,9kb plazmidu a gen

ermB na 3,6kb plazmidu. Jeden izolát měl v chromozomu gen *aacA-aphD* pro rezistenci ke gentamicinu. Izolát bez malých plazmidů měl zachovanou rezistenci k tetracyklinu díky integraci *tetK* do chromozomu zprostředkované IS*257*. To poukazuje na mobilitu genů rezistence a zdůrazňuje roli inzerčních sekvencí ve vývoji ostrovů rezistence na chromozomu. *S. haemolyticus* může také nést gen *cfr*, v transpozonu na 40kb plazmidu podobném plazmidu u MRSA, který nese tento gen (Fessler a kol., 2013).

1.3.5 Genetické elementy podílející se na přenosu

Kombinovaná rezistence ke gentamicinu, tobramycinu a kanamycinu u stafylokoků je spojena s transpozonem Tn*4001*, složeným transpozonem o velikosti asi 4,5 kb s genem *aacA/aphD* obklopeným obrácenými inzerčními sekvencemi IS*256* (Lange a kol., 2003; Obr. 8). Produkt genu má acetyltransferázovou aktivitu na aminokonci a fosfotransferázovou aktivitu na karboxykonci. Gen se nachází na konjugativních i nekonjugativních plazmidech o velikosti 20,8 až 57 kb a byl nalezen u *S. warneri* a *S. sciuri* v elementech podobných transpozonu Tn*4001*.

Obrázek 8. Oblast genu *aacA/aphD* v transpozonu Tn*4001* (Lange a kol., 2003).



Plazmid pSK108 *S. epidermidis* velký 2,4 kb nese gen *qacC* způsobující multirezistenci (Leelaporn a kol., 1995). DNA segment obsahující gen *qacC* je zřejmě genová kazeta, která se do buňky dostala horizontálním přenosem. U *S. epidermidis* byly také izolovány plazmidy způsobující rezistenci k penicilinu (Totten a kol., 1981). Jeden z těchto plazmidů kódoval také rezistenci ke kadmiu, další k etidium bromidu. Tyto vlastnosti jsou také spojeny s plazmidy *S. aureus* kódujícími rezistenci k penicilinu. Dva kmeny *S. epidermidis* nesly plazmidy pro rezistenci k tetracyklinům nerozeznatelné od tetracyklinových plazmidů *S. aureus*. Tyto výsledky nasvědčují tomu, že mezi *S. aureus* a *S. epidermidis* dochází k horizontálnímu přenosu in vivo.

2. Cíle práce

Cílem práce bylo stanovit rezistence k antibiotikům u vybraných kmenů koaguláza-negativních stafylokoků druhů *S. petrasii*, *S. haemolyticus* a *S. sciuri*, identifikovat a charakterizovat jejich plazmidy, srovnat je mezi sebou a s plazmidy u *S. aureus.*

Dílčí cíle:

1. Stanovit rezistence k antibiotikům u vybraných kmenů KNS
2. Stanovit obsah plazmidů v jejich buňkách
3. Najít korelace mezi rezistencí k antibiotikům a přítomností plazmidů
4. Stanovit velikost plazmidů restrikčním štěpením
5. Srovnat plazmidy různých kmenů a druhů stafylokoků
6. Detekovat geny rezistence na plazmidech pomocí PCR.

3. Materiál a metody

3.1 Bakteriální kmeny

V práci bylo analyzováno především 12 kmenů *S. petrasii*, které pochází z NRL/St (viz Tab. 3). Z jiných druhů byly využity také 2 kmeny *S. haemolyticus* a 4 kmeny *S. sciuri* a pro srovnání též 2 kmeny *S. aureus*. Kmeny *S. haemolyticus* byly izolovány v roce 1998 a zaslány prof. V. Hájkem (LF UP Olomouc). Kmeny *S. sciuri* pochází z Prahy od dr. P. Petráše. MRSA kmen COL byl zaslán prof. Hermínií De Lancastre (Laboratório de Genética Molecular, Instituto de Tecnologia Química e Biológica, Oeiras, Portugal), MRSA kmen S281 pochází od doc. R. Karpíškové (VÚVeL, Brno). Jako pozitivní kontroly při detekci genů rezistence k antibiotikům pomocí PCR byly použity MRSA kmeny E14 a E19 (Tab. 4).

Tabulka 3. Analyzované kmeny *S. petrasii*.

Č. NRL/St	Datum dodání do NRL	Lokalita	Materiál	Pohlaví	Věk
07/427	květen 2007	České Budějovice	hemokultura	muž	56
08/435	květen 2008	České Budějovice	hemokultura	žena	41
08/525	červenec 2008	Šternberk	hemokultura	muž	68
12/356	květen 2012	Litomyšl	ejakulát	muž	58
12/584	květen 2012	-	hemokultura	-	-
13/014	leden 2013	Litomyšl	moč	muž	2
13/057	leden 2013	Liberec	hemokultura	žena	50
13/078	únor 2013	Litomyšl	moč	žena	64
13/113	březen 2013	Horažďovice	nemocniční prostředí	-	-
13/114	březen 2014	Horažďovice	nemocniční prostředí	-	-
93/321	duben 1993	Praha	léze	žena	-
94/190	únor 1994	Praha	appendix	muž	-

-…nebylo uvedeno

Tabulka 3. (pokračování)

Č. NRL/St	Onemocnění
07/427	horečka neznámého původu
08/435	sekundární zhoubný novotvar mizních uzlin
08/525	-
12/356	chronická prostatitida
12/584	-
13/014	infekce močových cest
13/057	respirační selhání
13/078	zhoubný novotvar prsu
13/113	-
13/114	-
93/321	dermatitida
94/190	akutní apendicitida

-…nebylo uvedeno

Tabulka 4. MRSA kmeny použité jako pozitivní kontroly pro detekci genů rezistence k antibiotikům.

Kmen	Geny rezistence
E14	*tetM*
E19	*cat, ermA, ermC*

tetM…gen rezistence k tetracyklinu; *cat*…gen rezistence k chloramfenikolu; *ermA, ermC*…geny rezistence k erytromycinu

3.2 Kultivační média, roztoky a chemikálie

MPB (masopeptonový bujón)

Živný bujón (Oxoid) 13 g

Kvasnicový extrakt (Oxoid) 3 g

Pepton (Imuna) 5 g

Destilovaná voda 1 l

MPA (masopeptonový agar)

Živný bujón (Oxoid)	13 g
Kvasnicový extrakt (Oxoid)	3 g
Pepton (Imuna)	5 g
Agar (Oxoid)	15 g
Destilovaná voda	1 l

HMFM (Hognessovo zamražovací médium)

3,6mM K_2HPO_4	0,164 g
1,3mM KH_2PO_4	0,035 g
2,0mM citrát sodný	0,118 g
1,0mM $MgSO_4.7H_2O$	0,049 g
4,4% glycerol	8,8 ml

Doplněno destilovanou vodou do objemu 200 ml

MHA (Mueller-Hintonův agar)

PBS

NaCl	8 g
KCl	0,2 g
$Na_2HPO_4.2H_2O$	1,95 g
KH_2PO_4	0,24 g

H_2O	800 ml

Upraveno na pH 7,4 a doplněno vodou do 1 l

SDS

10%

50× TAE

TRIS	242 g
Ledová kyselina octová	57,1 ml
0,5M EDTA (pH = 8)	100 ml

Doplněno destilovanou vodou do objemu 1 l

1× TAE

50× TAE	20 ml
Destilovaná voda	980 ml

Agaróza

SERVA (Lachema)

DNA markery

2log marker (New England BioLabs Inc., 100 – 10 000 bp)

100bp marker (New England BioLabs Inc., 100 – 1517 bp)

Nanášecí pufr

Bromfenolová modř	0,15 g
Sacharóza	24 g

Doplněno vodou do objemu 60 ml

Směs na barvení gelů

Etidium bromid	60 µl
TAE	60 ml

Tetracyklin

Sigma-Aldrich, rozpuštěn v etanolu

Erytromycin

Sigma-Aldrich, rozpuštěn v etanolu

Streptomycin

Sigma-Aldrich, rozpuštěn ve vodě

Chloramfenikol

Lékárna Pekařská, rozpuštěn v etanolu

Disky s antibiotiky

Vankomycin, chloramfenikol, erytromycin, tetracyklin, oxacilin, ampicilin, streptomycin

Lach-Ner s r. o.

Lysozym

10 mg/ml

Lyzostafin

0,5 mg/ml

Restrikční endonukleázy

*Hin*dIII, *Bam*HI, *Nco*I, *Alu*I, *Hha*I, *Nde*I (New England BioLabs Inc.)

*Cla*I (Boehringer Mannheim)

*Eco*RI, *Hpa*I (Roche)

*Hae*III (Promega)

Materiál na PCR

Primery (viz Tab. 5)

Master mix FastStart PCR Master (Taq DNA Polymeráza, PCR pufr, dNTP, $MgCl_2$; Roche)

Tabulka 5. PCR primery využité pro detekci genů rezistence k antibiotikům.

Gen	Primer	Sekvence	Velikost produktu [bp]	Zdroj
cat	cat-Up	5'-GCG ACG GAG AGT TAG GTT-3'	417	Kuntová, 2006
	cat-Low	5'-GCC TAT CTG ACA ATT CCT GA-3'		
ermA	ermA1	5'-AAG CGG TAA ACC CCT CTG A-3'	190	Strommenger a kol., 2003
	ermA2	5'-TTC GCA AAT CCC TTC TCA AC-3'		
ermC	ermC1	5'-AAT CGT CAA TTC CTG CAT GT-3'	299	Strommenger a kol., 2003
	ermC2	5'-TAA TCG TGG AAT ACG GGT TTG-3'		
tetK	tetK-F	5'-TCG ATA GGA ACA GCA GTA-3'	169	Ng a kol., 2001
	tetK-R	5'-CAG CAG ATC CTA CTC CTT-3'		
tetM	tetM-F	5'-GTG GAC AAA GGT ACA ACG AG-3'	406	Ng a kol., 2001
	tetM-R	5'-CGG TAA AGT TCG TCA CAC AC-3'		

cat…gen pro rezistenci k chloramfenikolu; *ermA*, *ermC*…geny pro rezistenci k erytromycinu; *tetK* a *tetM*…geny pro rezistenci k tetracyklinu

3.3 Pomůcky a přístroje

Kity na izolaci plazmidové DNA

NucleoSpin Plasmid (Macherey-Nagel)

High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche)

Přístroje na elektroforézu

Elektroforetická vana (Biometra)

Zdroj 2197 Power Supply (LKB Bromma)

Program na focení gelů GeneSys

Fotoaparát a box na focení gelů InGenius 3 (Syngene)

Spektrofotometr

NanoDrop 2000c (Thermo Scientific)

Centrifugy

MiniSpin Plus (Eppendorf)

Mikro 220R Hettich (Schoeller)

Jouan BR4i (Thermo)

Termostaty

Biological Thermostat BT120 (Laboratorní přístroje Praha)

Bio TDB-120 (Biosan)

Přístroje na PCR

T Gradient Thermocycler (Biometra)

PCR Box UVC/T-M-AR (Biosan)

Vodní lázeň

Julabo TW12 (Schoeller)

Biohazard box

Steril-Antares (Schoeller)

Autoklávy

Tuttnauer 3870 EL (Schoeller)

Tuttnauer 3870 ELV (Schoeller)

Tuttnauer 2840 EL (Schoeller)

Lednice a mrazáky

Liebherr Premium

Liebherr Medline

Sanyo (Schoeller)

Pipety

Proline (Biohit)

Proline Plus (Biohit)

Váhy

Navigator (OHAUS)

SI-64A Denver Instrument (Merci s r. o.)

Mikrovlnná trouba

Moulinex

Magnetické míchátko

MM-4 (LAVAT a. s. Chotutice)

Další pomůcky

Plynový kahan

Mikrozkumavky

Kónické zkumavky

Plastové špičky na pipety

Stojánky

Plastové Petriho misky

Kyvety

Kovové kličky

Skleněné hokejky

Ochranné rukavice

3.4 Pracovní postupy

3.4.1 Izolace plazmidové DNA

- izolační kit NucleoSpin Plasmid (Macherey-Nagel):

1. 20 µl zásobní kultury bylo očkováno do 20 ml MPB a inkubováno přes noc ve 37 °C.

2. 7 ml kultury bylo centrifugováno ve 14ml kónických zkumavkách v předem vychlazené centrifuze při 4000 rpm/15 min/10 °C.

3. Po slití supernatantu byl sediment resuspendován v 5 ml PBS a opět centrifugován při 4000 rpm/15 min/10 °C.

4. Sediment byl resuspendován ve 250 µl roztoku A1 a přenesen do 1,5ml mikrozkumavky. Bylo přidáno 20 µl lyzostafinu (o koncentraci 0,5 mg/ml) a 2 µl lysozymu (o koncentraci 10 mg/ml) pro lyzi buněk (v případě kmenů *S. aureus* byl přidán pouze lyzostafin).

5. Mikrozkumavky s lyzujícími buňkami byly inkubovány ve 37 °C 30 až 60 minut (při lyzi buněk došlo k projasnění a zvýšení viskozity).

6. Po lyzi bylo k buňkám přidáno 250 µl roztoku A2, obsah zkumavek byl opatrně promíchán převracením a ponechán 5 minut v pokojové teplotě.

7. Poté bylo přidáno 300 µl roztoku A3 a po promíchání byly mikrozkumavky centrifugovány při 13000 rpm/10 min/25 °C. Centrifugace byla opakována, pokud nebyl supernatant čirý.

8. Supernatant byl přemístěn na kolonku a centrifugován při 13000 rpm/1 min/10 °C.

9. Po slití průtoku bylo přidáno 500 µl roztoku AW předehřátého na 55 °C a kolonka byla opět centrifugována při 13000 rpm/1 min/10 °C.

10. Vzorek byl dále promyt 600 µl roztoku A4 a opět centrifugován při 13000 rpm/ 1 min/10 °C.

11. Kolonka byla znovu centrifugována při 13000 rpm/1 min/10 °C pro vysušení a filtr byl přenesen do nové mikrozkumavky.

12. Na filtr bylo přidáno 20 µl elučního pufru AE a po 3 minutách centrifugováno při 13000 rpm/1 min/10 °C. Krok byl opakován s dalšími 20 µl elučního pufru pro větší výtěžek.

- izolační kit High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche):

1. 20 µl zásobní kultury bylo očkováno do 20 ml MPB a inkubováno přes noc ve 37 °C.
2. 7 ml kultury bylo centrifugováno ve 14ml kónických zkumavkách v předem vychlazené centrifuze při 4500 rpm/15 min/10 °C.
3. Po slití supernatantu byl sediment resuspendován v 5 ml PBS a opět centrifugován při 4500 rpm/15 min/10 °C.
4. Byla připravena lyzační směs z 235 µl roztoku 1, 20 µl lyzostafinu (o koncentraci 0,5 mg/ml) a 2 µl lysozymu (o koncentraci 10 mg/ml). Sediment byl v této směsi resuspendován a přenesen do 1,5ml mikrozkumavky.
5. Mikrozkumavky s lyzujícími buňkami byly inkubovány ve 37 °C 30 až 60 minut.
6. Po lyzi bylo k buňkám přidáno 250 µl roztoku 2, obsah zkumavek byl opatrně promíchán převracením a ponechán 5 minut v pokojové teplotě.
7. Roztok 3 byl chlazen na ledu a 350 µl bylo přidáno do směsi v mikrozkumavkách. Po promíchání byly mikrozkumavky ponechány 5 minut na ledu a centrifugovány při 13000 rpm/10 min/4 °C.
8. Supernatant byl přemístěn na kolonku a centrifugován při 13000 rpm/1 min/10 °C.
9. Po slití průtoku bylo přidáno 500 µl roztoku 4 a kolonka byla opět centrifugována při 13000 rpm/1 min/10 °C.
10. Vzorek byl dále promyt 700 µl roztoku 5 a opět centrifugován při 13000 rpm/ 1 min/10 °C.
11. Kolonka byla znovu centrifugována při 13000 rpm/1 min/10 °C pro vysušení a filtr byl přenesen do nové mikrozkumavky.
12. Na filtr bylo přidáno 40 µl elučního pufru 6 předehřátého na 60 °C a po 10 minutách centrifugováno při 13000 rpm/1 min/10 °C.

3.4.2 Gelová elektroforéza

1. Byl připraven 1,2% agarózový gel o výšce 5 mm a šířce a délce formy rozvařením odpovídajícího množství agarózy (SERVA) v TAE pufru.
2. Gel byl po ztuhnutí vložen do elektroforetické vany s TAE pufrem a bylo na něj naneseno 8 µl vzorku smíchaného s nanášecím pufrem, stejně jako 4 µl markeru (2log).
3. Napětí pro elektroforetickou separaci bylo nastaveno podle délky vany (5 V/cm).
4. Po skončení separace (přibližně 1 h) byl gel barven v roztoku etidium bromidu nejméně 15 minut, promyt ve vodě a DNA byla zviditelněna v UV záření.

3.4.3 Restrikční analýza plazmidů

1. Restrikční směs o objemu 20 µl byla vytvořena smícháním vody na PCR, vzorku v množství obsahujícím 1 µg DNA, 2 µl vhodného pufru a 5 U restrikčního enzymu.
2. Směs byla lehce promíchána pipetou a centrifugována několik vteřin při 7000 rpm.
3. Mikrozkumavky s restrikční směsí byly pokryty parafínovým filmem a inkubovány přes noc ve 37 °C.

3.4.4 Testování rezistence k antibiotikům

- disková difuzní metoda

1. 20 µl zásobní kultury bylo očkováno do 20 ml MPB a inkubováno přes noc ve 37 °C.
2. Kultura byla naředěna na 0,5 OD (odpovídající 150 milionům buněk/ml).

3. 200 µl naředěné kultury bylo očkováno na Petriho misku s MPA a rozetřeno sterilní hokejkou.

4. Po zaschnutí byly na misku s kulturou rozmístěny disky s antibiotiky a kultura byla inkubována 16-20 h při 37 °C.

5. Po inkubaci byly změřeny průměry inhibičních zón kolem disků a srovnány s referenční hodnotou.

3.4.5 Uchovávání bakteriálních kultur

1. Bakteriální kultura byla naočkována na misku s MPA a kultivována přes noc.

2. Plná klička kultury byla resuspendována v 500 µl HMFM ve sterilní mikrozkumavce a uchovávána v -70 °C.

3.4.6 Eliminace plazmidů

- eliminace pomocí 0,002% SDS

1. 20 µl zásobní kultury bylo naočkováno do 20 ml MPB, byly přidány 4 µl 10% SDS a kultura byla inkubována 24 h ve 37 °C.

2. Kultura byla ředěna 10×, 100× a 1000×. 100 µl takto naředěné kultury bylo očkováno na misky s MPA a rozetřeno hokejkou. Misky byly inkubovány přes noc ve 37 °C.

3. Misky s vhodným počtem kolonií (zhruba 50-100) byly otisknuty pomocí razítka se sterilním sametem na misky s antibiotiky (max. 2× z jedné misky, každé antibiotikum testováno ve dvou opakováních pro větší pravděpodobnost záchytu kolonií s eliminovanými plazmidy). Koncetrace antibiotik v MPA na miskách byly voleny podle hraničních hodnot EUCAST (www.eucast.org, Tab. 6).

4. Kolonie na miskách s antibiotiky byly srovnány s těmi na původních miskách bez antibiotik.

Tabulka 6. Koncentrace antibiotik v MPA pro testování eliminace plazmidů.

Antibiotikum	Koncentrace (µg/ml)
Streptomycin	20
Erytromycin	5
Tetracyklin	5
Chloramfenikol	10

3.4.7 Izolace celkové DNA kmenů po eliminaci plazmidů

- pro následné ověření nepřítomnosti genů rezistence na chromozomu pomocí PCR

1. 5 µl zásobní kultury kmenů po eliminaci plazmidů bylo naočkováno do 1 ml bujónu a kultura byla inkubována 18 h ve 37 °C.
2. Bujón s narostlou kulturou byl centrifugován při 12000 rpm/4 min/4-8 °C. Sediment byl resuspendován v 1 ml PBS, opět centrifugován při 12000 rpm/4 min/4-8 °C, resuspendován v 1 ml PBS a vystaven teplotě 80 °C po dobu 20 minut.
3. PBS s lyzovanými buňkami byl opět centrifugován při 12000 rpm/4 min/4-8 °C a supernatant byl použit neředěný na PCR.

3.4.8 Detekce genů rezistence k antibiotikům

Byla provedena PCR na detekci genů rezistence k antibiotikům. Složení PCR směsi a postup PCR jsou uvedeny v tabulkách (Tab. 7, Tab. 8). Testovaná DNA byla naředěna na koncentraci přibližně 7 µg/ml.

Tabulka 7. Složení PCR směsi.

Reagencie	Zásobní koncentrace	Výsledná koncentrace	Objem [µl]
PCR pufr	10×	1×	2,5
$MgCl_2$	50 mM	1,5 mM	0,75
dNTP	2 mM	200 µM	2,5
primer R	100 µM	0,8 µM	0,2
primer F	100 µM	0,8 µM	0,2
DNA polymeráza	5 U/µl	0,05 U/µl	0,25
templátová DNA	7 µg/ml	0,8 µg/ml	3
voda			do 25

Tabulka 8. Program PCR.

Počáteční denaturace	94 °C	3'	1×
Denaturace	94 °C	30''	30×
Nasedání primerů	55 °C	30''	
Prodlužování primerů	72 °C	45''	
Závěrečné prodlužování primerů	72 °C	4'	1×

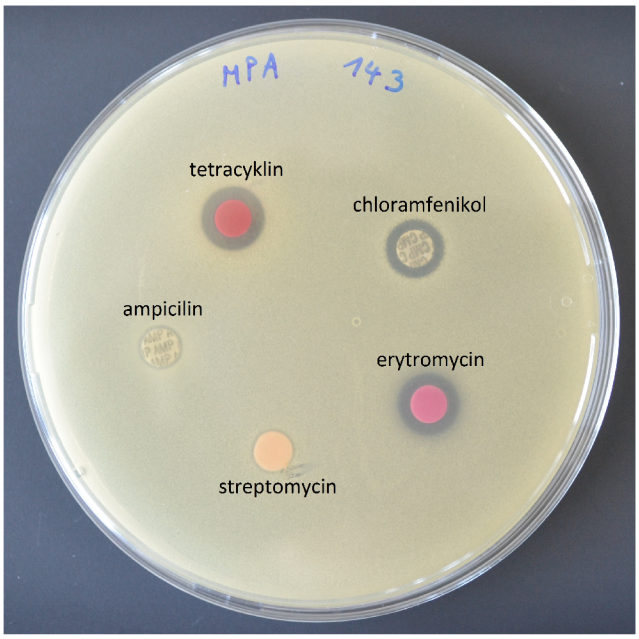
4. Výsledky

4.1 Rezistence k antibiotikům

Rezistence k antibiotikům byla testována diskovou difuzní metodou (Obr. 9). Použity byly disky s chloramfenikolem, tetracyklinem, streptomycinem, erytromycinem, ampicilinem, oxacilinem a vankomycinem. Inhibiční zóny byly stejné na MHA i na MPA. Rezistence u jednotlivých kmenů jsou uvedeny níže (Tab. 9).

Rezistence k vankomycinu není uvedena, protože její testování diskovou difúzní metodou je nespolehlivé. Všechny kmeny byly podle testování na vankomycin citlivé. Nespolehlivé se prokázalo i testování rezistence k oxacilinu touto metodou, všechny kmeny byly totiž při testování rezistentní, inhibiční zóny u většiny kmenů *S. petrasii* však byly větší než u MRSA kmenů COL a S281. Častá byla rezistence k inhibitorům proteosyntézy, která je běžně kódována na plazmidu.

Obrázek 9. Testování rezistence k antibiotikům kmene 143 *S. haemolyticus* diskovou difúzní metodou.



Kmen je rezistentní ke všem testovaným antibiotikům (průměr inhibičních zón je menší než hraniční hodnota).

Tabulka 9. Rezistence k antibiotikům u jednotlivých kmenů.

Druh	Kmen	Rezistence
S. aureus	COL	tet, str, amp
	S281	tet, str, amp
S. haemolyticus	39	chl, ery, str, amp
	143	chl, ery, tet, str, amp
S. petrasii	07/427	tet, amp, (str)
	08/435	tet, amp, str
	08/525	tet, str, amp
	12/356	ery, tet, str, amp
	12/584	ery, amp, (str)
	13/014	(str)
	13/057	ery, tet, str, amp
	13/078	ery, tet, amp, (str)
	13/113	ery, amp, (str)
	13/114	ery, amp, (str)
	93/321	ery, tet, str, amp
	94/190	(str)
S. sciuri	575	-
	581	-
	583	ery
	612	-

tet…rezistence k tetracyklinu; str…streptomycinu; amp…ampicilinu; chl…chloramfenikolu; ery…erytromycinu; -…kmen nebyl rezistentní k žádnému testovanému antibiotiku; rezistence je uvedena v závorce u kmenů s výrazně větší inhibiční zónou

4.2 Stanovení obsahu plazmidů

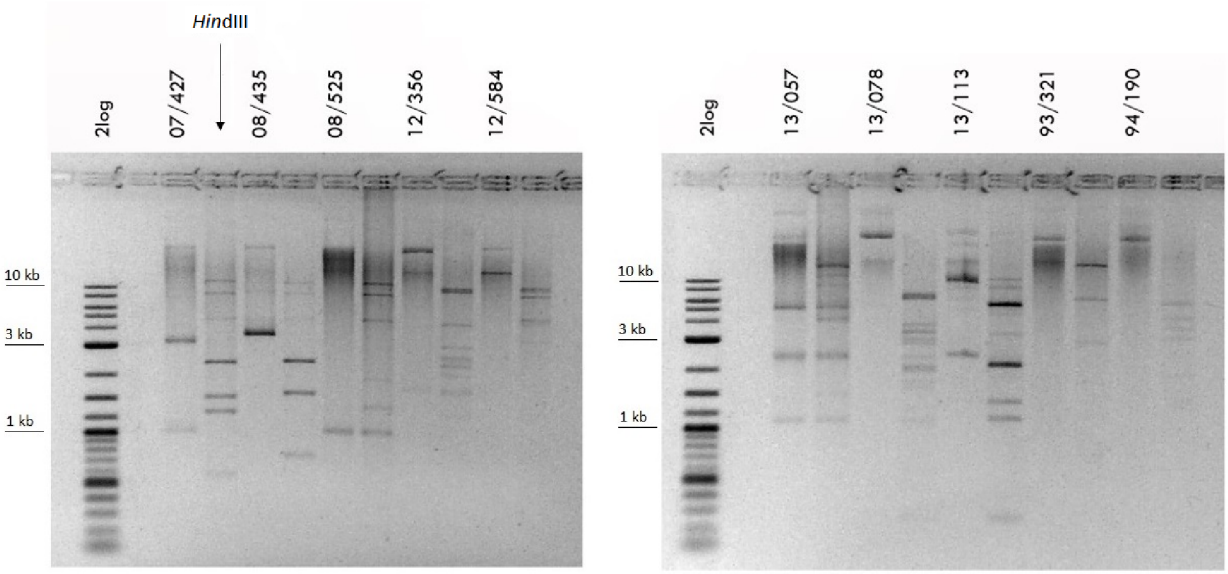
Plazmidová DNA byla izolována pomocí izolačních kitů NucleoSpin Plasmid (Macherey-Nagel) a High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche). Buňky byly lyzovány lyzostafinem (*S. aureus*) nebo lysozymem a lyzostafinem (KNS). Buňky *S. aureus* lyzovaly lyzovaly lépe než buňky KNS (již po 20 minutách byly vzorky znatelně projasněné a viskózní). Kmeny *S. sciuri* a *S. petrasii* lyzovaly pomalu, lépe při přidání dalších 10 µl lyzostafinu a v termostatu Bio TDB-120 (Biosan) lépe než v Biological Thermostat BT120 (Laboratorní přístroje Praha). Koncentrace plazmidové DNA se pohybovala mezi 20 a 240 ng/µl (většinou kolem 70 ng/µl). Přítomné plazmidy jsou uvedeny v tabulce

(Tab. 10) a znázorněny na gelu (Obr. 10 a 11) spolu s fragmenty po štěpení RE *Hin*dIII. U kmenů *S. sciuri* nebyly objeveny žádné plazmidy (Obr. 12).

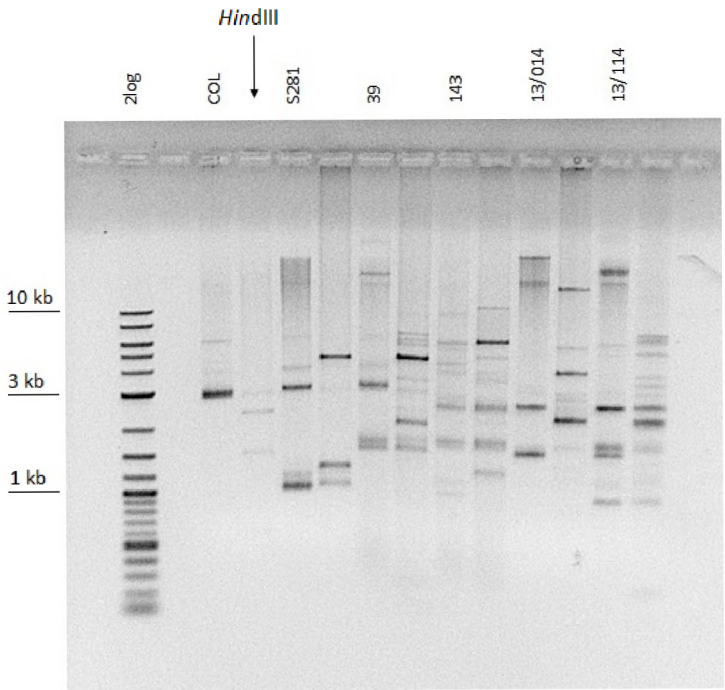
Tabulka 10. Plazmidy přítomné u kmenů *S. aureus* a KNS.

Druh	Kmen	Počet plazmidů	Velikost [kb]
S. aureus	COL	1	4,5
	S281	2	4,5; 1,4
S. haemolyticus	39	3	12; 4,7; 2,1
	143	5	25; 6; 3,2; 1,8; 1,4
S. petrasii	07/427	3	25; 4,5; 1,5
	08/435	3	25; 5; 2,5
	08/525	2	25; 1,3
	12/356	2	24; 2,5
	12/584	2	27; 15
	13/014	3	25; 4; 2,3
	13/057	4	26; 6; 3,2; 1,4
	13/078	1	26
	13/113	2	28; 2,9
	13/114	4	22; 4; 2,2; 1,5
	93/321	2	24; 2,5
	94/190	1	20
S. sciuri	575	0	-
	581	0	-
	583	0	-
	612	0	-

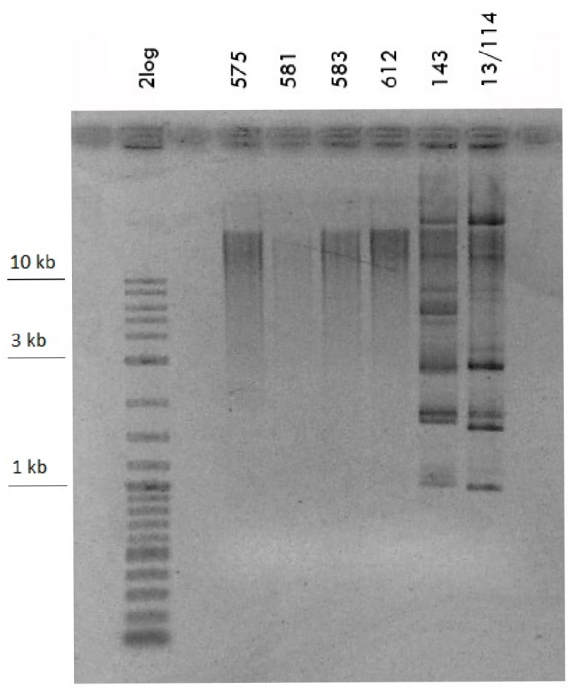
Obrázek 10. Plazmidy u kmenů *S. petrasii*, v sousedních jamkách vlevo neštěpené a vpravo štěpené RE *Hin*dIII (1,2% agarózový gel, TAE, 5 V/cm).



Obrázek 11. Plazmidy u *S. aureus* COL a S281, *S. haemolyticus* 39 a 143 a *S. petrasii* 13/014 a 13/114, v sousedních jamkách vlevo neštěpené a vpravo štěpené RE *Hin*dIII (1,2% agarózový gel, TAE, 5 V/cm).



Obrázek 12. Nepřítomnost plazmidů u kmenů *S. sciuri* 575, 581, 583 a 612 (1,2% agarózový gel, TAE, 5 V/cm).



Pro srovnání použity plazmidy kmenů 143 *S. haemolyticus* a 13/114 *S. petrasii*.

4.3 Restrikční analýza plazmidů

K restrikční analýze bylo použito několik různých RE, mnoho enzymů totiž plazmidy vůbec neštěpilo, případně štěpilo na velké množství fragmentů, které nebylo možné přiřadit k neštěpeným plazmidům. Použity byly RE *Hin*dIII, *Eco*RI, *Bam*HI, *Hae*III, *Alu*I, *Cla*I, *Hpa*I, *Hha*I, *Nde*I a *Nco*I, vybrané podle štěpení podobných plazmidů se známou sekvencí. V následující tabulce jsou uvedena restrikční místa enzymů (Tab. 11). Štěpení plazmidů je uvedeno v tabulce (Tab. 12) a znázorněno na gelech (Obr. 13-16; na obrázcích jsou pouze štěpené plazmidy).

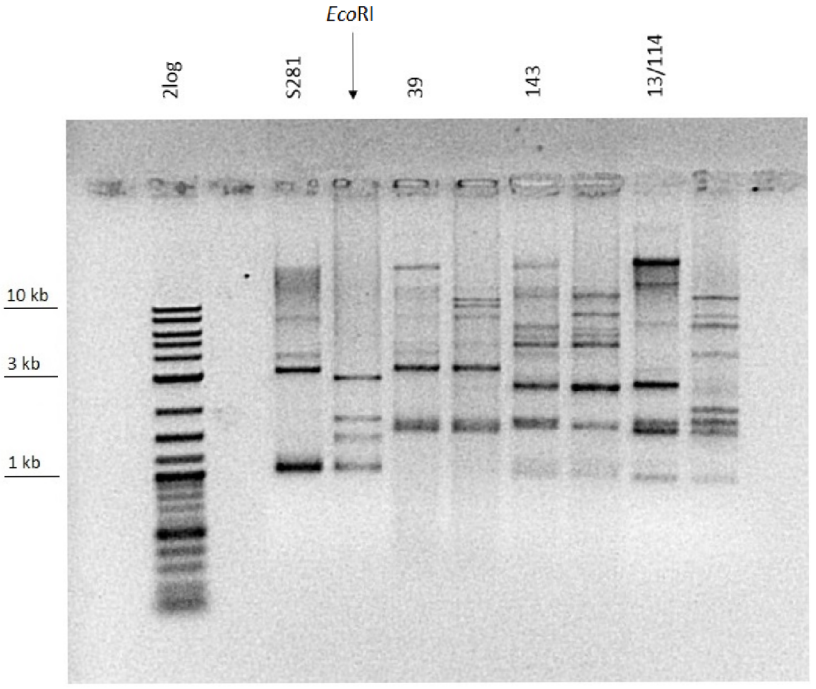
Tabulka 11. Restrikční místa použitých RE.

RE	Rozpoznávaná sekvence
Hin dIII	A^AGCTT
Eco RI	G^AATTC
Bam HI	G^GATCC
Hae III	GG^CC
Alu I	AG^CT
Cla I	AT^CGAT
Hpa I	GTT^AAC
Hha I	GCG^C
Nde I	CA^TATG
Nco I	C^CATGG

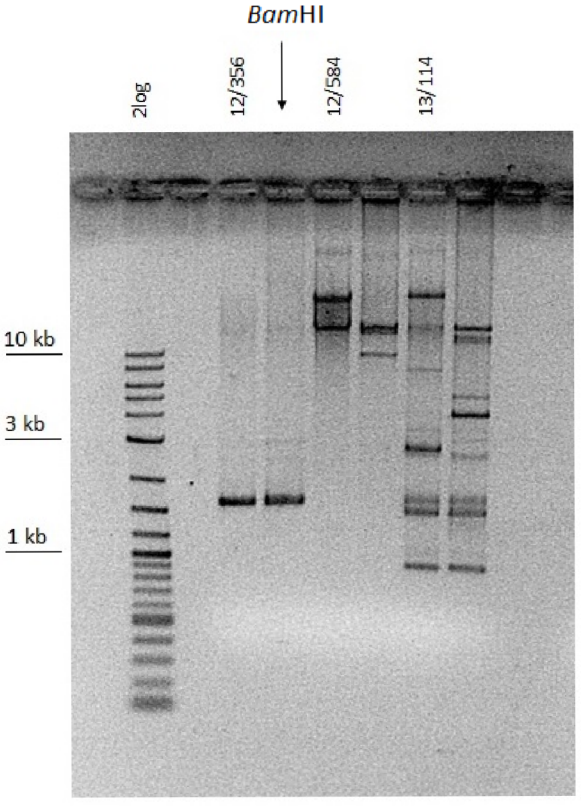
Tabulka 12. Počet a velikost plazmidů u analyzovaných kmenů stafylokoků a výsledky jejich restrikční analýzy.

Druh	Kmen	Počet plazmidů	Velikost [kb]	Počty a velikosti fragmentů získaných restrikčním štěpením
S. aureus	COL	1	4,5	2,5 + 1,5 + 0,5 (*Hin* dIII); 2,5 + 2 (*Hpa* I); linearizace (*Nco* I, *Cla* I)
	S281	2	4,5	2,8 + 1,7 (*Eco* RI); linearizace (*Hin* dIII, *Cla* I)
			1,4	linearizace (*Hin* dIII)
S. haemolyticus	39	3	12	6 + 4 + 2 (*Hin* dIII); 7 + 5 (*Cla* I)
			4,7	2,5 + 2,2 (*Nco* I); linearizace (*Cla* I)
			2,1	linearizace (*Hin* dIII, *Nco* I, *Hpa* I)
	143	5	25	8 + 7 + 6 + 4,5 (*Hae* III); 12 + 9 + 5 (*Hin* dIII); 9 + 8 + 6 (*Cla* I)
			6	linearizace (*Hpa* I, *Cla* I)
			3,2	linearizace (*Cla* I)
			1,8	neštěpený
			1,4	linearizace (*Hin* dIII, *Cla* I)
S. petrasii	07/427	3	25	8 + 7 + 6 + 4,5 (*Hae* III); 12 + 9 + 5 (*Hin* dIII)
			4,5	2,5 + 1,5 + 0,5 (*Hin* dIII); 2,5 + 2 (*Hpa* I); linearizace (*Nco* I, *Cla* I)
			1,5	linearizace (*Hpa* I, *Hin* dIII)
	08/435	3	25	12 + 9 + 4,5 (*Hin* dIII)
			5	2,6 + 1,6 + 0,8 (*Hin* dIII)
			2,5	linearizace (*Nde* I, *Hha* I)
	08/525	2	25	12 + 9 + 4,5 (*Hin* dIII)
			1,3	linearizace (*Hin* dIII)
	12/356	2	24	10 + 4,5 + 2,8 + 2,5 + 2 (*Hin* dIII)
			2,5	linearizace (*Nde* I, *Hha* I)
	12/584	2	27	8 + 6 + 4 + 3 + 2,8 + 2 + 1,2 (*Hae* III); 10 + 10 + 4 (*Hin* dIII)
			15	8 + 4 + 3 (*Hin* dIII)
	13/014	3	25	20 + 5 (*Hin* dIII)
			4	linearizace (*Hin* dIII)
			2,3	linearizace (*Hin* dIII)
	13/057	4	26	12 + 10 + 4 (*Hin* dIII)
			6	linearizace (*Nde* I, *Hha* I)
			3,2	linearizace (*Nde* I, *Hha* I)
			1,4	neštěpený
	13/078	1	26	6 + 3,7 + 3,3 + 3 + 3 + 2,5 + 2 + 1,6 + 1,1 (*Hin* dIII)
	13/113	2	28	10 + 8 + 5,5 + 3 + 2,1 (*Hin* dIII)
			2,9	1,4 + 1,2 + 0,3 (*Hin* dIII)
	13/114	4	22	8 + 6 + 4 + 4 + 0,3 (*Hin* dIII); 12 + 4,5 + 2,8 + 2,4 (*Bam* HI)
			4	linearizace (*Bam* HI)
			2,2	linearizace (*Hin* dIII, *Hpa* I, *Nco* I)
			1,5	neštěpený
	93/321	2	24	12 + 6 + 3 + 1,8 + 0,8 + 0,7 (*Hin* dIII)
			2,5	linearizace (*Nde* I, *Hha* I)
	94/190	1	20	5,5 + 4 + 3,5 + 3 + 1,7 + 1 (*Hin* dIII)

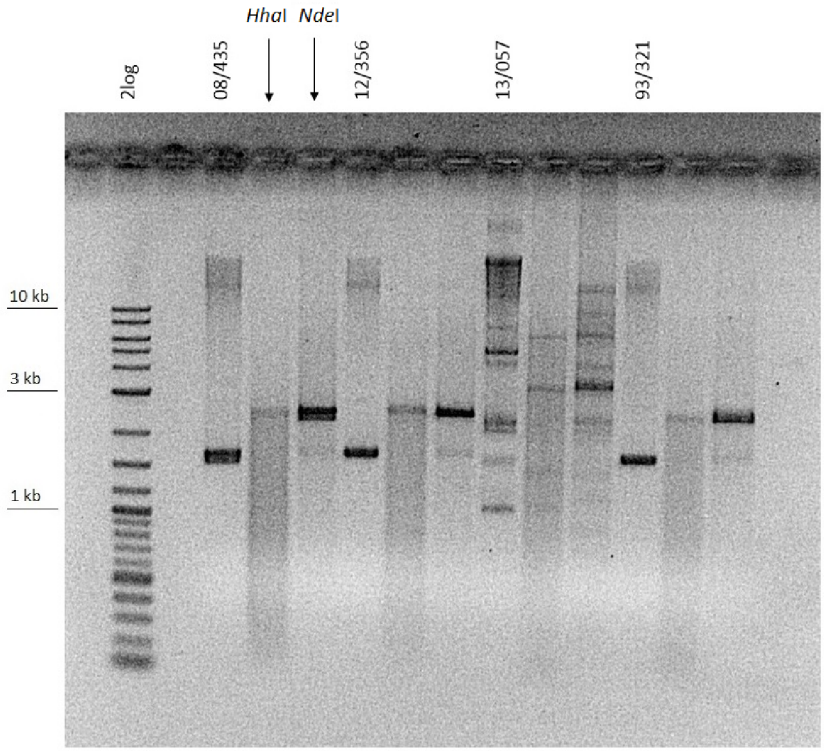
Obrázek 13. Restrikční analýza plazmidů *S. aureus* S281, *S. haemolyticus* 39 a 143 a *S. petrasii* 13/114, v sousedních jamkách vlevo neštěpené plazmidy, vpravo štěpené RE *Eco*RI (1,2% agarózový gel, TAE, 5 V/cm).



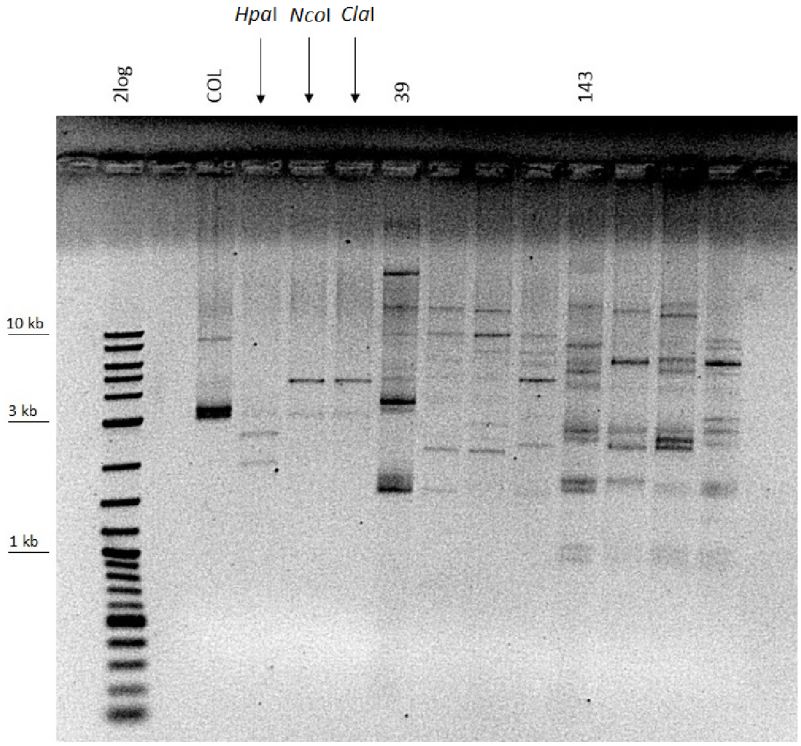
Obrázek 14. Restrikční analýza plazmidů kmenů *S. petrasii*, v sousedních jamkách vlevo neštěpené plazmidy, vpravo štěpené RE *Bam*HI (1,2% agarózový gel, TAE, 5 V/cm).



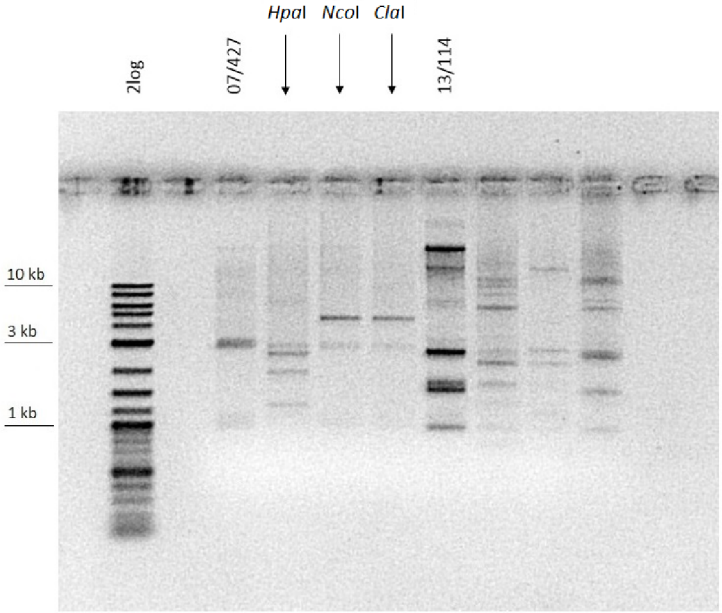
Obrázek 15. Restrikční analýza plazmidů kmenů *S. petrasii*, v sousedních jamkách vlevo neštěpené plazmidy, vpravo štěpené RE *Hha*I a *Nde*I (1,2% agarózový gel, TAE, 5 V/cm).



Obrázek 16. Restrikční analýza plazmidů kmenů *S. aureus* COL, *S. haemolyticus* 39 a 143 a *S. petrasii* 07/427 a 13/114, v sousedních jamkách vlevo neštěpené plazmidy, vpravo štěpené RE *Hpa*I, *Nco*I a *Cla*I (1,2% agarózový gel, TAE, 5 V/cm).



Obrázek 16. (pokračování)



4.4 Srovnání plazmidů různých druhů KNS

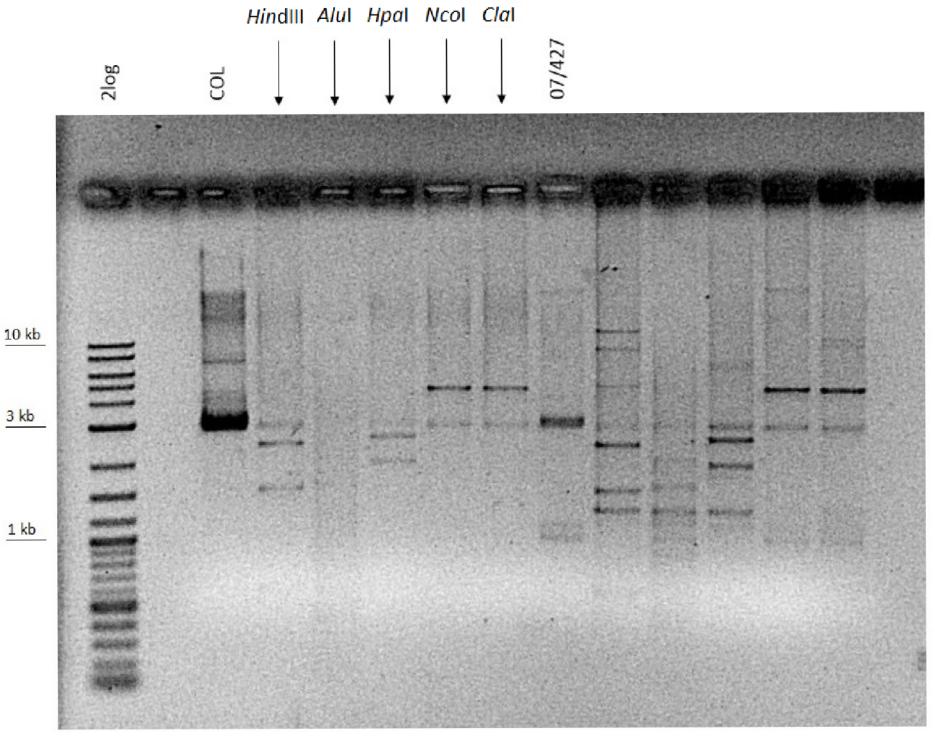
Plazmidy jednotlivých kmenů, především u různých druhů, byly srovnány podle velikosti a restrikčních fragmentů. Byla objevena shoda plazmidů u jednoho kmene *S. aureus* a jednoho kmene *S. petrasii*, dále u jednoho kmene *S. haemolyticus* a *S. petrasii* a možná byla také shoda plazmidu u tří kmenů *S. petrasii*. Shodné plazmidy a jejich restrikční fragmenty jsou zaznačeny v tabulce (Tab. 13) a znázorněny na gelech (Obr. 17-19).

Tabulka 13. Shodné plazmidy a jejich štěpení RE.

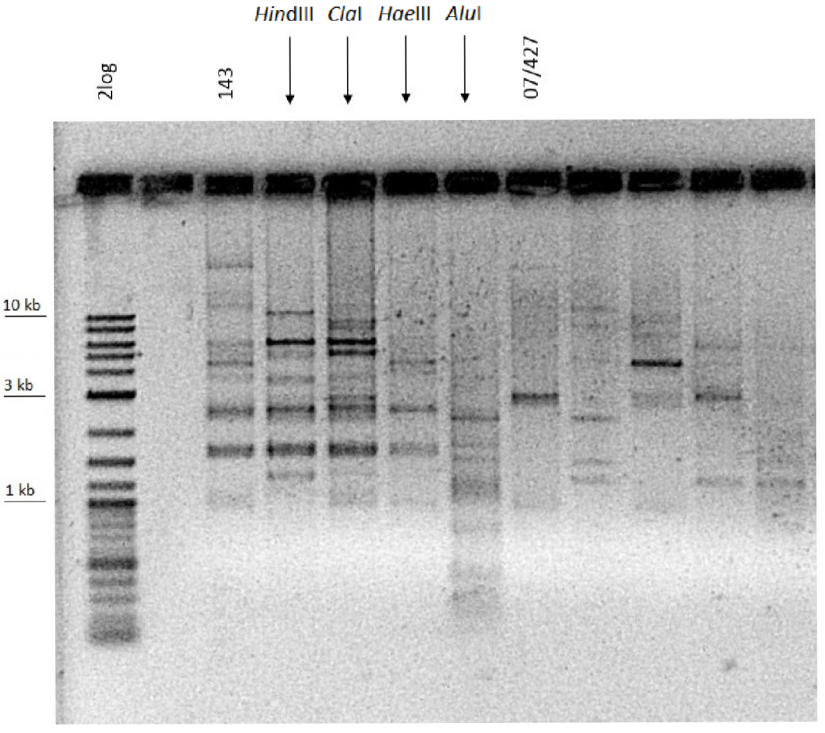
Druh	Kmen	Plazmid [kb]	Počty a velikosti fragmentů získaných restrikčním štěpením
S. aureus	COL	4,5	2,5 + 1,5 + 0,5 (*Hin* dIII); 2,5 + 2 (*Hpa* I); linearizace (*Nco* I, *Cla* I)
S. haemolyticus	143	25	8 + 7 + 6 + 4,5 (*Hae* III); 12 + 9 + 5 (*Hin* dIII); 9 + 8 + 6 (*Cla* I)
S. petrasii	07/427	25	8 + 7 + 6 + 4,5 (*Hae* III); 12 + 9 + 5 (*Hin* dIII)
		4,5	2,5 + 1,5 + 0,5 (*Hin* dIII); 2,5 + 2 (*Hpa* I); linearizace (*Nco* I, *Cla* I)
	08/435	2,5	linearizace (*Nde* I, *Hha* I)
	12/356	2,5	linearizace (*Nde* I, *Hha* I)
	93/321	2,5	linearizace (*Nde* I, *Hha* I)

Fragmenty *Cla*I u kmene 07/427 *S. petrasii* byly špatně viditelné, ale zdají se být stejné jako u kmene 143 *S. haemolyticus*.

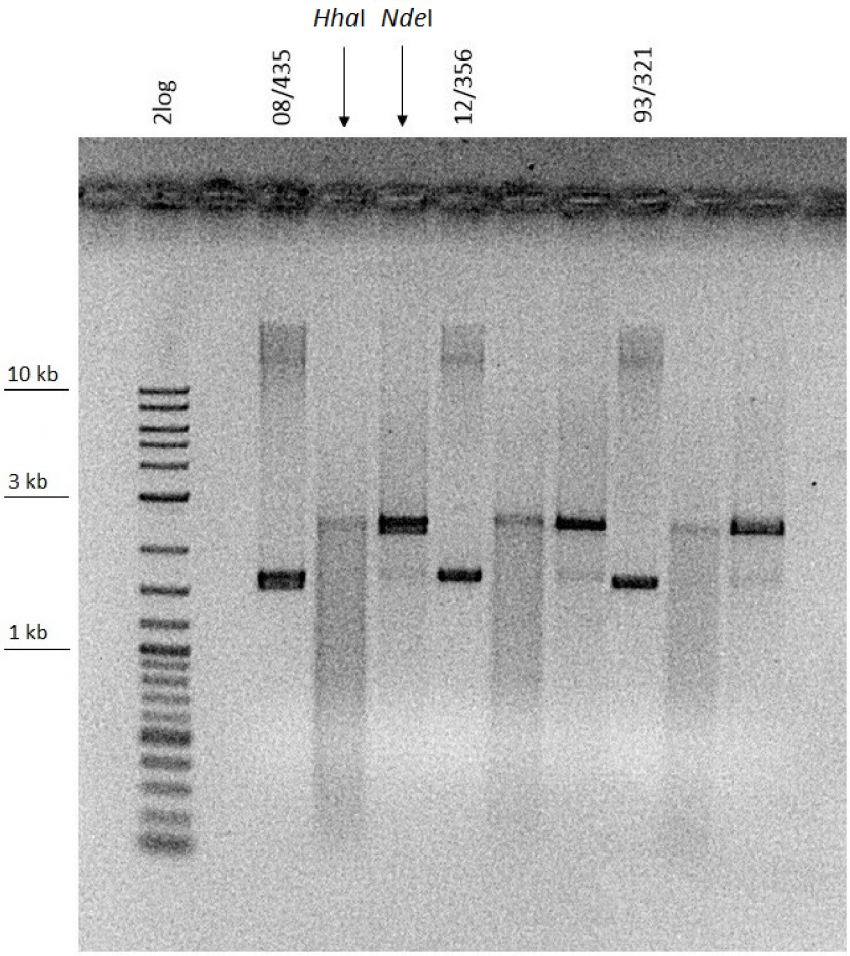
Obrázek 17. Srovnání 4,5kb plazmidu u kmenů *S. aureus* COL a *S. petrasii* 07/427, v sousedních jamkách vlevo neštěpené plazmidy, vpravo štěpené RE *Hin*dIII, *Alu*I, *Hpa*I, *Nco*I a *Cla*I (1,2% agarózový gel, TAE, 5 V/cm).



Obrázek 18. Srovnání 25kb plazmidu u kmenů *S. haemolyticus* 143 a *S. petrasii* 07/427, v sousedních jamkách vlevo neštěpené plazmidy, vpravo štěpené RE *Hin*dIII, *Cla*I, *Hae*III a *Alu*I (1,2% agarózový gel, TAE, 5 V/cm).



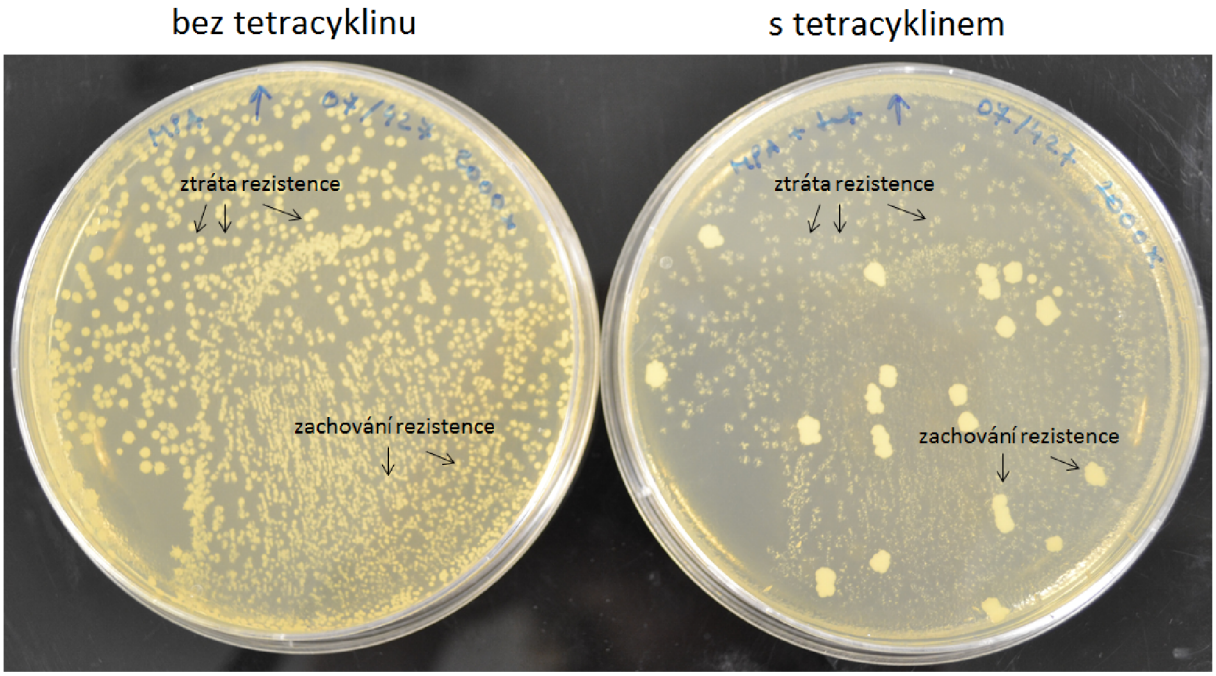
Obrázek 19. Srovnání 2,5kb plazmidu u kmenů *S. petrasii* 08/435, 12/356 a 93/321, v sousedních jamkách vlevo neštěpené plazmidy, vpravo štěpené RE *Hpa*I, *Nco*I a *Cla*I (1,2% agarózový gel, TAE, 5 V/cm).



4.5 Eliminace plazmidů

Eliminace plazmidů byla provedena pomocí SDS. Po kultivaci v médiu s SDS byly kolonie vyrostlé na médiu bez antibiotika přenesené razítkem na médium s antibiotikem (Obr. 20). U kolonií se ztrátou rezistence k antibiotikům byla izolována plazmidová DNA. Ztráta rezistence a odpovídajících plazmidů je uvedena v tabulce (Tab. 14). Ztráta plazmidů je znázorněna na gelu (Obr. 21).

Obrázek 20. Kolonie kmene 07/427 *S. petrasii* po působení SDS na misce bez antibiotika a s antibiotikem.

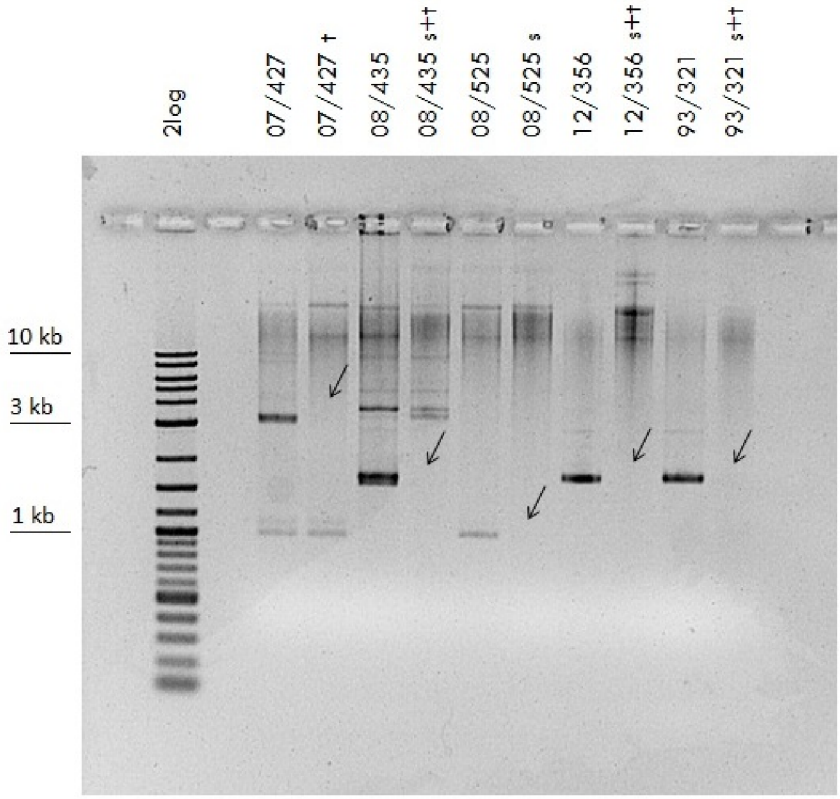


Tabulka 14. Ztráta plazmidů a rezistence k antibiotikům po kultivaci v médiu s SDS u kmenů *S. petrasii*.

Druh	Kmen	Ztráta plazmidu [kb]	Ztráta rezistence
S. petrasii	07/427	4,5	tet
	08/435	2,5	tet, str
	08/525	1,3	str
	12/356	2,5	tet, str
	93/321	2,5	tet, str

tet…ztráta rezistence k tetracyklinu; str…k streptomycinu

Obrázek 21. Ztráta plazmidů po kultivaci v médiu s SDS u kmenů *S. petrasii*, v sousedních jamkách vlevo plazmidová DNA před eliminací, vpravo po eliminaci (1,2% agarózový gel, TAE, 5 V/cm).



t…kmen se ztrátou rezistence k tetracyklinu; s…streptomycinu; s+t…streptomycinu i tetracyklinu

4.6 Detekce genů rezistence k antibiotikům

Byla provedena PCR pro detekci genů rezistence k antibiotikům na izolovaných plazmidech. Často byly přítomné geny *tetK* a *tetM* způsobující rezistenci k tetracyklinu a *ermA* a *ermC* kódující rezistenci k erytromycinu. Testována byla také přítomnost genů *ermB* a *msrA* pro rezistenci k erytromycinu, ty však nebyly přítomné u žádného kmene. Výsledky jsou uvedeny v tabulce (Tab. 15) a znázorněny na obrázcích (Obr. 22-25). U kmenů, u kterých došlo k eliminaci plazmidů, byla ověřena přítomnost detekovaných genů rezistence na plazmidech (nebyly přítomné na chromozomu).

Tabulka 15. Geny rezistence k antibiotikům detekované na plazmidech pomocí PCR.

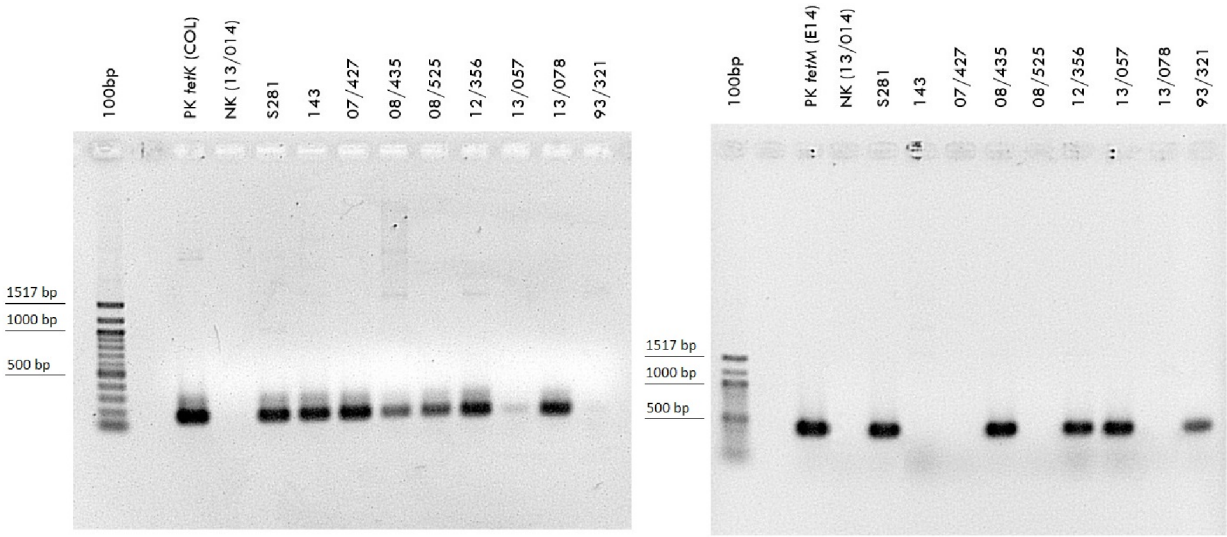
Druh	Kmen	Rezistence	Geny rezistence
S. aureus	COL	tet, str, amp	*tetK*
	S281	tet, str, amp	*tetK, tetM*
S. haemolyticus	39	chl, ery, str, amp	*ermC, ermA*
	143	chl, ery, tet, str, amp	*tetK*
S. petrasii	07/427	tet, amp, (str)	*tetK*
	08/435	tet, amp, str	*tetK, tetM*
	08/525	tet, str, amp	*tetK*
	12/356	ery, tet, str, amp	*tetK, tetM, ermA*
	12/584	ery, amp, (str)	
	13/014	(str)	
	13/057	ery, tet, str, amp	*tetK, tetM, ermA*
	13/078	ery, tet, amp, (str)	*tetK, ermC*
	13/113	ery, amp, (str)	
	13/114	ery, amp, (str)	*ermC*
	93/321	ery, tet, str, amp	*tetM, ermA*
	94/190	(str)	

Kmeny po eliminaci plazmidů

Druh	Kmen	Ztráta rezistence	Ztráta genu
S. petrasii	07/427	tet	*tetK*
	08/435	tet, str	*tetK, tetM*
	12/356	tet, str	*tetK, tetM*
	93/321	tet, str	*tetM*

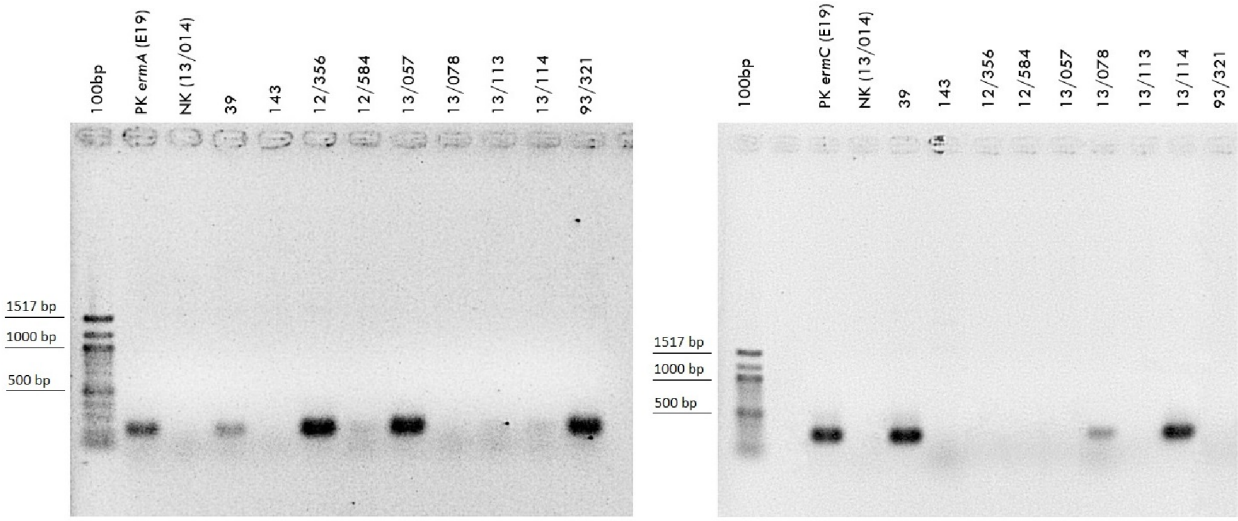
tet…rezistence k tetracyklinu; str…streptomycinu; amp…ampicilinu; chl…chloramfenikolu; ery…erytromycinu; rezistence je uvedena v závorce u kmenů s výrazně větší inhibiční zónou; *tetK*, *tetM*…geny rezistence k tetracyklinu; *ermA*, *ermC*…geny rezistence k erytromycinu

Obrázek 22. Přítomnost genů *tetK* a *tetM* u kmenů *S. aureus* S281, *S. haemolyticus* 143 a *S. petrasii* 07/427, 08/435, 08/525, 12/356, 13/057, 13/078 a 93/321 rezistentních k tetracyklinu (1,2% agarózový gel, TAE, 5 V/cm).



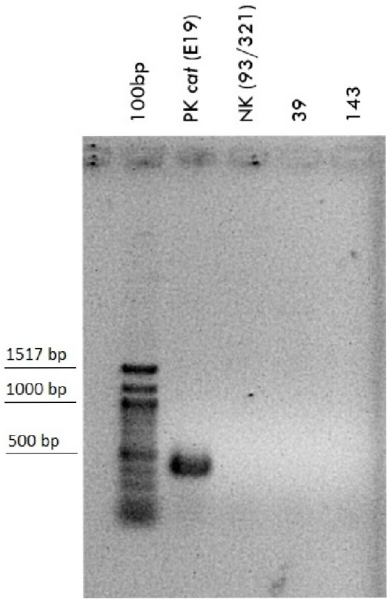
PK…pozitivní kontrola (*S. aureus* COL a E14); NK…negativní kontrola (*S. petrasii* 13/014).

Obrázek 23. Přítomnost genů *ermA* a *ermC* u kmenů *S. haemolyticus* 39 a 143 a *S. petrasii* 12/356, 12/584, 13/057, 13/078, 13/113, 13/114 a 93/321 rezistentních k erytromycinu (1,2% agarózový gel, TAE, 5 V/cm).



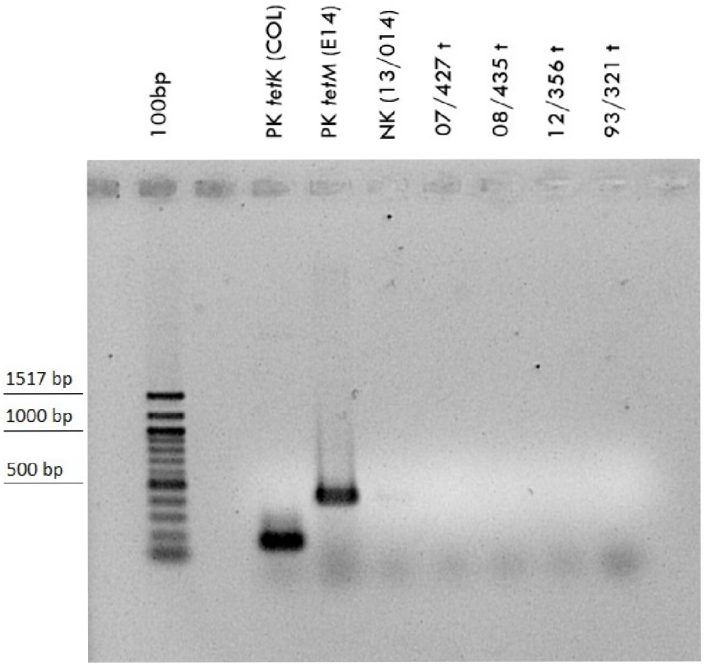
PK…pozitivní kontrola (*S. aureus* E19); NK…negativní kontrola (*S. petrasii* 13/014).

Obrázek 24. Nepřítomnost genu *cat* u kmenů *S. haemolyticus* rezistentních k chloramfenikolu (1,2% agarózový gel, TAE, 5 V/cm).



PK…pozitivní kontrola (*S. aureus* E19); NK…negativní kontrola (*S. petrasii* 93/321).

Obrázek 25. Nepřítomnost genů rezistence k tetracyklinu v DNA kmenů *S. petrasii*, u kterých došlo k eliminaci plazmidů (1,2% agarózový gel, TAE, 5 V/cm).



PK…pozitivní kontrola (*S. aureus* COL a E14); NK…negativní kontrola (*S. petrasii* 13/014).

5. Diskuze

Cílem práce bylo stanovit rezistenci k antibiotikům u vybraných druhů koaguláza-negativních stafylokoků izolovaných z klinického materiálu, zjistit, zda je rezistence kódována plazmidy a zda se tyto plazmidy liší, nebo jsou shodné, což by svědčilo o jejich horizontálním přenosu a šíření v populacích stafylokoků.

5.1 Testování rezistence k antibiotikům

Rezistence k antibiotikům byla zjišťována pomocí disků s antibiotiky. Zpočátku byly k testování použity misky s MHA, výsledky však byly stejné i při použití MPA. Z antibiotik byly vybrány především inhibitory proteosyntézy, na které se u KNS často vyskytuje rezistence kódovaná na plazmidu (Schwarz a kol., 2011). Mnohé z testovaných kmenů byly rezistentní k streptomycinu, tetracyklinu a erytromycinu, 2 kmeny *S. haemolyticus* také k chloramfenikolu. Častá byla u kmenů také rezistence k ampicilinu.

Testována byla také rezistence k oxacilinu, všechny kmeny ovšem byly podle velikosti inhibičních zón rezistentní, i když průměr inhibiční zóny byl často jen o málo menší než hraniční hodnota (zhruba u poloviny kmenů *S. petrasii*, zbylé testované kmeny neměly žádné inhibiční zóny). Metoda je tedy pro testování rezistence k meticilinu nespolehlivá. Stejně tak je disková difuzní metoda nespolehlivá pro testování rezistence k vankomycinu, všechny kmeny tvořily velké inhibiční zóny. Rezistenci k oběma antibiotikům by bylo vhodnější testovat např. přidáním antibiotika do růstového média.

5.2 Stanovení přítomnosti plazmidů

Plazmidy byly izolovány pomocí izolačních kitů NucleoSpin Plasmid (Macherey-Nagel) a High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche). Buňky koaguláza-negativních druhů působením lyzostafinu pomalu lyzovaly, problém byl vyřešen mírným zvýšením

přidaného množství lyzostafinu a lysozymu a změnou termostatu (v původním byly vzorky pomaleji zahřívány). Koncentrace plazmidové DNA byla různá, většinou kolem 50-80 ng/µl. Plazmidy byly přítomné u většiny kmenů, často ve vyšším počtu. K podobnému zjištění dospěli také Koura a kol. (2007) a Schiwon a kol. (2013).

Izolovaná plazmidová DNA byla separována gelovou elektroforézou. U některých kmenů bylo obtížné stanovit počet plazmidů, na gelu totiž vytvořily velký počet proužků, které mohly představovat jejich různé izoformy. Pro stanovení přesného počtu plazmidů byly použity dva přístupy: plazmidy byly štěpeny restrikčními endonukleázami a byla provedena eliminace plazmidů (viz dále).

5.3 Restrikční analýza plazmidů

Pro stanovení velikosti plazmidů bylo provedeno restrikční štěpení pomocí různých restrikčních endonukleáz. Použity byly enzymy *Hin*dIII, *Eco*RI, *Bam*HI, *Hae*III, *Alu*I, *Cla*I, *Hpa*I, *Hha*I, *Nde*I a *Nco*I. Enzymy byly vybrány podle restrikčních míst u podobných plazmidů KNS se známou sekvencí (s podobnou velikostí nebo s geny způsobující rezistenci přítomnou u testovaných kmenů), případně podle restrikčních enzymů použitých u KNS v dřívějších studiích (Kessie a kol., 1998). Mnoho plazmidů bylo štěpeno RE *Hin*dIII, často došlo také ke štěpení RE *Cla*I, naopak malé množství plazmidů bylo štěpeno *Bam*HI.

Velikost plazmidů byla nejprve odhadnuta podle pozice neštěpené formy plazmidu v gelu, odhad byl ale velmi nepřesný, protože byl použit lineární marker a neštěpené plazmidy byly převážně v kružnicové formě. Mohlo se také jednat o různé izoformy stejného plazmidu. Proto bylo provedeno restrikční štěpení a velikost plazmidů byla stanovena jako součet fragmentů. U některých kmenů však bylo přítomno několik plazmidů, a tedy velký počet fragmentů po štěpení. V těchto případech bylo obtížné přiřadit příslušné fragmenty k plazmidům.

Většinu plazmidů se podařilo některými enzymy naštěpit, velikost ostatních byla odhadnuta podle plazmidů jiných kmenů se stejnou elektroforetickou pohyblivostí u neštěpené formy. Nepřesné bylo stanovení velikosti také u velkých plazmidů a fragmentů, které byly při elektroforéze méně oddělené. Stanovení velikosti bylo také tím méně přesné,

čím dál se nanesené vzorky nacházely od markeru, proto byly vzorky naneseny blíž k markeru na jiném gelu.

Problémy by mohly být řešeny vyřezáním jednotlivých proužků z gelu a jejich štěpením, to by však bylo kvůli velkému množství a blízkosti proužků časově a technicky náročné. Pro přesnější odhad velikosti velkých plazmidů a fragmentů by mohla být DNA separována déle, menší proužky a fragmenty by pak ale prošly celým gelem. Vhodná je také eliminace některých plazmidů a štěpení zbylých plazmidů, jak bylo dále provedeno. K podobným výsledkům dospěli Kuntová a kol. u *S. aureus* (2012).

5.4 Srovnání plazmidů různých druhů KNS

Plazmidy jednotlivých kmenů, především kmenů různých druhů, byly srovnány podle pohyblivosti na gelu a podle restrikčního štěpení. Tři z přítomných plazmidů byly podle výsledků restrikční analýzy shodné. 4,5kb plazmidy u *S. aureus* COL a *S. petrasii* 07/427 byly shodně štěpeny RE *Hin*dIII, *Hpa*I, *Nco*I a *Cla*I a neštěpeny ostatními použitými enzymy. Jako identické se jevily také 2,5kb plazmidů přítomných u kmenů *S. petrasii* 08/435, 12/356 a 93/321. Tyto plazmidy byly linearizovány působením enzymů *Nde*I a *Hha*I a neštěpeny ostatními endonukleázami. Shodné by mohly být i plazmidy velké 25 kb u kmene *S. haemolyticus* 143 a *S. petrasii* 07/427, které byly shodně štěpeny enzymy *Hin*dIII a *Hae*III. Fragmenty po štěpení *Cla*I byly u kmene 07/427 špatně viditelné, zdají se však být také stejné jako u kmene 143.

4,5kb plazmid kmenů COL a 07/427 byl shodně štěpen čtyřmi enzymy a neštěpen ostatními, jde tedy s velkou pravděpodobností o stejný plazmid. Pro ověření shody by mohly být plazmidy štěpeny dalšími enzymy a sekvenovány. Také byly podrobeny PCR pro detekci genů rezistence k antibiotikům. 25kb plazmidy u kmenů 143 a 07/427 byly shodně štěpeny třemi enzymy, fragmenty však nebyly v některých případech dobře viditelné. Řešením by mohlo být vyřezání proužků z gelu a jejich štěpení, zakoncentrování izolované plazmidové DNA, případně opět další enzymy a sekvenace. Totéž platí u 2,5kb plazmidů u kmenů 08/435, 12/356 a 93/321, které byly štěpeny shodně dvěma enzymy a to jen na jednom místě. Na těchto plazmidech byly také detekovány geny rezistence pomocí PCR.

Plazmidy u testovaných kmenů byly srovnány s plazmidy se známou sekvencí (http://www.ncbi.nlm.nih.gov). Některé plazmidy byly podobné, přesná shoda však nebyla nalezena žádná. 20kb plazmid kmene *S. petrasii* 94/190 byl stejně velký a podobně (ne však zcela stejně) štěpený enzymem *Hin*dIII jako plazmid pSAS *S. aureus* nesoucí geny *cad* pro rezistenci ke kadmiu a *bla* pro rezistenci k β-laktamům. Velikostí je podobný také 4kb plazmid kmene *S. petrasii* 13/114 plazmidu *S. hyicus* p981071-1 nesoucímu gen *ermC* pro rezistenci k erytromycinu, který byl detekován také u testovaného kmene. 25kb plazmid kmene *S. haemolyticus* 143 byl podobný plazmidu pSCFS6 *S. warneri*, nesoucímu geny *fexA* a *cfr* pro rezistenci k chloramfenikolu. Kmen *S. haemolyticus* 143 byl také rezistentní k chloramfenikolu, štěpení plazmidů restrikčními enzymy však bylo odlišné.

2,1kb plazmid kmene *S. haemolyticus* 39 se jevil podobný s 2,3kb plazmidem pNE131 *S. epidermidis* nesoucím gen *ermM* pro rezistenci k erytromycinu a s 2,4kb plazmidem pSK108 *S. epidermidis* s genem *qacC* pro rezistenci k toxickým kationickým sloučeninám. 26kb kmene *S. petrasii* 13/078 byl podobný 28kb plazmidu pSWS47 *S. epidermidis* nesoucímu gen *vgaA* pro rezistenci k streptograminu A, linkosamidům a pleuromutilinům. 2,5kb plazmid kmenů *S. petrasii* 08/435, 12/356 a 93/321 je velikostí a štěpením některými enzymy podobný 2,4kb plazmidu SAP078B *S. aureus* způsobujícímu rezistenci k makrolidům, linkosamidům a streptograminu B. 12kb plazmid kmene *S. haemolyticus* 39 se zase podobá 12kb plazmidu pSTE1 *S. hyicus* způsobujícímu rezistenci k streptomycinu.

5.5 Eliminace plazmidů

Eliminace plazmidů byla využita ke stanovení vlivu ztráty plazmidů na rezistence k antibiotikům u testovaných kmenů. Je to ideální metoda pro prokázání, které plazmidy zodpovídají za rezistenci k antibiotikům.

Metodou se podařilo eliminovat 3 různé plazmidy, z nichž jeden se nacházel u tří různých kmenů a zbylé dva u jednoho kmene. Kultura, u které došlo k eliminaci, ztratila rezistenci k tetracyklinu, nebo streptomycinu, případně k oběma antibiotikům. Při ztrátě 2,5kb plazmidu kmenů *S. petrasii* 08/435, 12/356 a 93/321 došlo zároveň ke ztrátě rezistence

k tetracyklinu i streptomycinu. To naznačuje, že tyto kmeny nesou identický plazmid s geny rezistence k tetracyklinu a streptomycinu. Výsledky eliminace ukazují také na shodu 4,5kb plazmidu u *S. aureus* COL a *S. petrasii* 07/427, o plazmidu u kmene COL (pT181) je totiž známo, že nese gen rezistence k tetracyklinu (Khan a Novick, 1983; Guay a kol., 1993), a po eliminaci plazmidu u kmene 07/427 došlo také ke ztrátě rezistence k tetracyklinu.

Koncentrace antibiotik na miskách byla stanovena nad hraniční hodnotu podle tabulek EUCAST, v případě streptomycinu podle předchozí studie (Stegmann a Perreten, 2010). Hodnoty byly vyšší než uvedené, protože při růstu bakterií v těchto koncentracích ještě nejde o rezistenci, ale až v případě růstu při koncentraci převyšující tuto hraniční hodnotu. U kmenů byly testovány různé koncentrace pohybující se kolem hraniční hodnoty a ve výsledcích nebyly rozdíly. Rezistence k mírně zvýšené koncentraci antibiotika má také větší praktický význam.

V některých případech po kultivaci v SDS kolonie nerostly, přestože nedošlo ke ztrátě žádného plazmidu. U otisknutých buněk pravděpodobně nedocházelo k expresi genů nebo obsahovaly menší počet kopií plazmidu. Pro ověření ztráty rezistence u kolonií, které ztratily plazmid, byla kultura po eliminaci naočkována na misku s antibiotikem a také podrobena testu rezistence diskovou difuzní metodou. Několik plazmidů se podařilo eliminovat a frekvence eliminace dosahovala až 100 %. Většinu plazmidů se však eliminovat nepodařilo, eliminace by se mohla opakovat víckrát, i když byl proveden velký počet opakování, nebo by bylo vhodné zkusit jinou metodu eliminace, např. pomocí kultivace při vyšší teplotě nebo s přidáním etidium bromidu (Lacey, 1975). Metody jsou však velmi časově náročné, v případě etidium bromidu také méně bezpečné.

5.6 Detekce genů rezistence k antibiotikům

Pomocí PCR byly detekovány geny rezistence k antibiotikům na izolované plazmidové DNA. U většiny kmenů rezistentních na tetracyklin byly nalezeny geny *tetK* a *tetM*, u kmenů rezistentních na erytromycin geny *ermA* a *ermC*. Tyto geny bývají také podle předchozích studií nejčastější příčinou rezistence k tetracyklinu a erytromycinu u stafylokoků

(Ergün a kol., 2012; Martineau a kol., 2000). Méně často se u stafylokoků vyskytují geny *ermB* a *msrA* (Matsuoka a kol., 1997; Zmantar a kol., 2011), které nebyly přítomné u žádného testovaného kmene. Z genů způsobujících rezistenci k chloramfenikolu byl testován pouze gen *cat*, který se nevyskytovat u žádného testovaného kmene.

U všech kmenů rezistentních na tetracyklin byl přítomný gen *tetK* nebo *tetM*. U některých kmenů nebyl detekován žádný gen rezistence k erytromycinu, geny pro rezistenci k erytromycinu se mohou nacházet na chromozomu (Vitali a kol., 2014). Rezistence k chloramfenikolu přítomná u dvou kmenů *S. haemolyticus* by mohla být kódována genem *fexA* nebo *cfr* (Kehrenberg a Schwarz, 2006), případně by gen rezistence mohl opět ležet na chromozomu. Vzhledem k tomu, že většina testovaných kmenů byla rezistentní k ampicilinu, nebyla provedena PCR pro detekci genů rezistence. Rezistence může být způsobena genem *blaZ* nacházejícím se na plazmidu (Olsen a kol., 2006).

Detekované geny by se mohly nacházet i na zbytcích chromozomové DNA po izolaci plazmidů, plazmidy by bylo opět možné vyřezat z gelu a detekovat geny na nich. I v tomto případě by se ale mohly ve vzorku nacházet zbytky chromozomové DNA. Podle očekávání nebyl u kmenů, které ztratily plazmidy při eliminaci, detekován žádný gen rezistence, což ukazuje, že se geny rezistence nacházejí na plazmidech. 2,5kb plazmidy u kmenů *S. petrasii* 08/435, 12/356 a 93/321 nesly geny rezistence k tetracyklinu, u kmenů 08/435 a 12/356 však byly přítomné geny *tetK* i *tetM*, zatímco na plazmidu kmene 93/321 byl detekován pouze gen *tetM*, jedná se tedy pravděpodobně jen o podobné plazmidy.

U plazmidů, které se nepodařilo eliminovat, by se mohla jejich zodpovědnost za rezistenci k antibiotikům prokázat přenesením těchto plazmidů do citlivých kmenů transdukcí a následným testováním rezistence u kmenů se získanými plazmidy.

6. Závěr

U 12 kmenů *S. petrasii*, 2 kmenů *S. haemolyticus* a 4 kmenů *S. sciuri* byla stanovena rezistence k antibiotikům. Většina kmenů byla aspoň na jedno antibiotikum rezistentní, velmi častá byla multirezistence (67 % kmenů). Nejčastější byla rezistence k streptomycinu (78 % kmenů), častá byla rezistence k ampicilinu (67 % kmenů), k erytromycinu (56 % kmenů) a k tetracyklinu (44 % kmenů).

Plazmidy byly přítomné u většiny kmenů (78 %), počet plazmidů u jednoho kmene dosahoval až 5. Kmeny rezistentní k většímu počtu antibiotik obsahovaly většinou také větší počet plazmidů. Kmen s největším počtem plazmidů byl rezistentní k největšímu počtu antibiotik, kmeny bez plazmidů většinou k žádnému antibiotiku.

Velikost plazmidů byla stanovena pomocí restrikční analýzy. S použitím deseti RE se podařilo většinu plazmidů štěpit a stanovit jejich velikost. Nejvhodnější se na štěpení plazmidů KNS ukázaly být enzymy *Hin*dIII a *Cla*I, téměř žádné plazmidy naopak neštěpil enzym *Bam*HI. Velikost plazmidů se pohybovala mezi 1,3-27 kb.

Plazmidy jednotlivých kmenů byly srovnány podle velikosti a restrikčních fragmentů. Byla nalezena podobnost tří plazmidů různých kmenů stafylokoků, které většinou patřily k jiným druhům. Plazmidy o velikosti 4,5 kb u kmene *S. aureus* COL a *S. petrasii* 07/427 byly shodně štěpeny čtyřmi enzymy, u kmene 07/427 došlo také se ztrátou plazmidu ke ztrátě rezistence k tetracyklinu, která je u kmene COL kódována na tomto plazmidu. U obou byl přítomný gen rezistence k tetracyklinu, který se na plazmidu nachází.

25kb plazmidy kmenů *S. haemolyticus* 143 a *S. petrasii* 07/427 byly shodně štěpeny třemi enzymy. 2,5kb plazmidy u kmenů *S. petrasii* 08/435, 12/356 a 93/321 jsou podle výsledků pouze podobné, u kmene 93/321 totiž na rozdíl od ostatních kmenů není přítomný jeden z genů rezistence k tetracyklinu.

Pomocí PCR byly v izolované plazmidové DNA detekovány geny rezistence. U většiny kmenů rezistentních k tetracyklinu byl nalezen gen *tetK* (90 % kmenů), často byly přítomné také geny *tetM* (50 % rezistentních kmenů), *ermA* (44 %) a *ermC* (33 %). Žádný

kmen rezistentní k erytromycinu nenesl geny *ermB* a *msrA*. Ze dvou kmenů rezistentních k chloramfenikolu nenesl ani jeden gen *cat*.

U kmenů, které ztratily plazmidy při eliminaci, nebyly detekovány žádné geny rezistence k antibiotikům, bylo tedy prokázáno jejich umístění na plazmidech. Metoda se ukázala jako vhodná pro potvrzení zodpovědnosti plazmidů za rezistenci k antibiotikům.

Práce ukázala, že rezistence k antibiotikům u koaguláza-negativních stafylokoků je podmíněna přítomností plazmidů, které nesou geny rezistence. Přítomnost příbuzných plazmidů u kmenů různých druhů naznačuje, že se tyto plazmidy mohou šířit horizontálním přenosem. Pro analýzu obsahu plazmidů a jejich molekulární charakterizaci je nezbytné použít několik metod. Získané výsledky budou doplněny sekvenováním a přenosem plazmidů do citlivých kmenů transdukcí.

7. Použitá literatura

Allignet J., Liassine N., El Solh N. (1998) Characterization of a staphylococcal plasmid related to pUB110 and carying two novel genes, *vatC* and *vgbB*, encoding resistance to streptogramins A and B and similar antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42: 1794-1798.

Antignac A., Thomasz A. (2009) Reconstruction of the phenotypes of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by replacement of the staphylococcal cassette chromosome *mec* with a plasmid-borne copy of *Staphylococcus sciuri pbpD* gene. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53: 435-441.

Arciola C. R., Campoccia D., Speziale P., Montanaro L., Costerton J. W. (2012) Biofilm formation in *Staphylococcus* implant infections. A review of molecular mechanisms and implications for biofilm-resistant materials. *Biomaterials* 33: 5967-5982.

Brenner D.G., Shaw W. V. (1985) The use of synthetic oligonucleotides with universal templates for rapid DNA sequencing: results with staphylococcal replicon pC221. *EMBO J.* 4: 561-568.

Cardoso M., Schwarz S. (1992) Chloramphenicol resistance plasmids in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis. *Vet. Microbiol.* 30: 223-232.

Chajecka-Wierzchowska W., Zadernowska A., Nalepa B., Sierpińska M., Łaniewska-Trokenheim Ł. (2014) Retail ready-to-eat food as a potential vehicle for *Staphylococcus* spp. harboring antibiotic resistance genes. *J. Food Prot.* 77: 993-998.

Couto I., De Lencastre H., Severina E., Kloos W., Webster J. A., Hubner R. J., Sanches I. S., Tomasz A. (1996) Ubiquitous presence of a *mecA* homologue in natural isolates of *Staphylococcus sciuri*. *Microb. Drug Resist.* 2: 377-391.

Couto I., Sanches I. S., Sa-Leao R., De Lencastre H. (2000) Molecular characterization of *Staphylococcus sciuri* strains isolated from humans. *J. Clin. Microbiol.* 38: 1136-1143.

Cramton S. E., Ulrich M., Götz F., Döring G. (2001) Anaerobic conditions induce expression of polysaccharide intercellular adhesin in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Infect. Immun.* 69: 4079-4085.

Cui L., Wang Y., Li Y., He T., Schwarz S., Ding Y., Shen J., Lv Y. (2013) Cfr-mediated linezolid-resistance among methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci from infections of humans. *PLoS One* 8: e57096.

Dakić I., Morrison D., Vuković D., Savić B., Shittu A., Ježek P., Hauschild T., Stepanović S. (2005) Isolation and molecular characterization of *Staphylococcus sciuri* in the hospital environment. *J. Clin. Microbiol.* 43: 2782-2785.

De Allori M. C., Jure M. A., Romero C., De Castillo M. E. (2006) Antimicrobial resistance and production of biofilms in clinical isolates of coagulase-negative *Staphylococcus* strains. *Biol. Pharm. Bull.* 29: 1592-1596.

De Bel A., Van Hoorde K., Wybo I., Vandoorslaer K., Echahidi F., De Brandt E., Schumann P., Ieven M., Soetens O., Piérard D., Vandamme P. (2013) *Staphylococcus jettensis* sp. nov., a coagulase negative staphylococcal species isolated from human clinical specimens. *Int. J. Syst. Evol. Micr.* 63: 3250-3256.

De Bel A., Švec P., Petráš P., Sedláček I., Pantůček R., Echahidi F., Piérard D., Vandamme P. (2014) Reclassification of *Staphylococcus jettensis* De Bel et al. 2013 as *Staphylococcus petrasii* subsp. *jettensis* subsp. nov. and emended description of *Staphylococcus petrasii* Pantucek et al. 2013. *Int. J. Syst. Evol. Micr.* 64: 4198-4201.

De Vos P., Garrity G., Jones D., Krieg N. R., Ludwig W., Rainey F. A., Schleifer K. H., Whitman W. B. (2009) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 3: The Firmicutes. Springer-Verlag, Berlin. 1450 s.

Do Carmo Ferreira N., Schuenck R. P., Dos Santos K. R., Do Carmo de Freire Bastos M., Giambiagi-deMarval M. (2011) Diversity of plasmids and transmission of high-level mupirocin *mupA* resistance gene in *Staphylococcus haemolyticus*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 61: 147-152.

Ergün Y., Aslantaş Ö., Kireçci E., Öztürk F., Ceylan A., Boyar, Y. (2012) Antimicrobial susceptibility, presence of resistance genes and biofilm formation in coagulase negative staphlococci isolated from subclinical sheep mastitis. *Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg.* 18: 449-456.

Faccone D., Togneri A. M., Podesta L., Perez M., Gagetti P., Sanchez S., Romero G., Corso A. (2014) MRSA pediatric clone expressing *erm*C plus *lnu*A genes causing nosocomial transmission and healthcare workers colonization in a neonatal intensive care unit. *Infect. Genet. Evol.* 25: 78-80.

Falcone M., Giannella M., Raponi G., Mancini C., Venditti M. (2006) Teicoplanin use and emergence of *Staphylococcus haemolyticus*: is there a link? *Clin. Microbiol. Infect.* 12: 96-97.

Falcone M., Campanile F., Giannella M., Borbone S., Stefani S., Venditti M. (2007) *Staphylococcus haemolyticus* endocarditis: clinical and microbiologic analysis of 4 cases. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 57: 325-331.

Fessler A. T., Kadlec K., Schwarz S. (2011) Novel apramycin resistance gene *apmA* in bovine and porcine methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55: 373-375.

Fessler A. T., Calvo N., Gutiérrez N., Muñoz Bellido J. L., Fajardo M., Garduño E., Monecke S., Ehricht R., Kadlec K., Schwarz S. (2013) Cfr-mediated linezolid resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus haemolyticus* associated with clinical infections in humans: two case reports. *J. Antimicrob. Chemother.* 69: 268-70.

Fischetti V. A. (2006) Gram-Positive Pathogens. ASM Press, Washington, D. C. 849 s.

García-Álvarez L., Holden M. T. G., Lindsay H., Webb C. R., Brown D. F. J., Curran M. D., Walpole E., Brooks K., Pickard D. J., Teale C., Parkhill J., Bentley S. D., Edwards G. F., Girvan E. K., Kearns A. M. a kol. (2011) Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel *mecA* homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study. *Lancet. Infect. Dis.* 11: 595-603.

Gatermann S. a Marre R. (1989) Cloning and expression of *Staphylococcus saprophyticus* urease gene sequences in *Staphylococcus carnosus* and contribution of the enzyme to virulence. *Infect Immun.* 57: 2998-3002.

Gatermann S., Kreft B., Marre R., Wanner G. (1992) Identification and characterization of a surface-associated protein (Ssp) of *Staphylococcus saprophyticus*. *Infect. Immun.* 60: 1055-1060.

Gerke C., Kraft A., Sussmuth R., Schweitzer O., Gotz F. (1998) Characterization of the N-acetylglucosaminyltransferase activity involved in the biosynthesis of the *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin. *J. Biol. Chem.* 273: 18586-18593.

Guay G. G., Khan S. A., Rothstein D. M. (1993) The *tet*(K) gene of plasmid pT181 of *Staphylococcus aureus* encodes an efflux protein that contains 14 transmembrane helices. *Plasmid* 30: 163-166.

Hanssen A. M., Kjeldsen G., Ericson Sollid J. U. (2004) Local variants of staphylococcal cassette chromosome *mec* in sporadic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci: evidence of horizontal gene transfer? *Antimicrob. Agents Chemother.* 48: 285-296.

Hassan K. A., Skurray R. A., Brown M. H. (2007) Active export proteins mediating drug resistance in staphylococci. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 12: 180-196.

Hauschild T., Schwarz S. (2003) Differentiation of *Staphylococcus sciuri* strains isolated from free-living rodents and insectivores. *J. Vet. Med. B* 50: 241-246.

Hauschild T., Wójcik A. (2007) Species distribution and properties of staphylococci from canine dermatitis. *Res. Vet. Sci.* 82: 1-6.

Hauschild T., Stepanović S., Vuković D., Dakić I., Schwarz S. (2009) Occurrence of chloramphenicol resistance and corresponding resistance genes in members of the *Staphylococcus sciuri* group. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 33: 383-384.

Hauschild T., Schwarz S. (2010) Macrolide resistance in *Staphylococcus* spp. from free-living small mammals. *Vet. Microbiol.* 144: 530-531.

He T., Wang Y., Schwarz S., Zhao Q., Shen J., Wu C. (2014) Genetic environment of the multi-resistance gene *cfr* in methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci from chickens, ducks, and pigs in China. *IJMM* 304: 257-261.

Hedin G., Widerstrom M. (1998) Endocarditis due to *Staphylococcus sciuri*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 17: 673-675.

Heilmann C., Thumm G., Chhatwal G. S., Hartleib J., Uekotter A., Peters G. (2003) Identification and characterization of a novel autolysin (Aae) with adhesive properties from *Staphylococcus epidermidis*. *Microbiology* 149: 2769-2778.

Inegol E., Turkyilmaz S. (2012) Determination of SCC*mec* types in methicillin resistant staphylococci isolated from cows and farm workers. *Ankara Univ. Vet. Fak. Derg.* 59: 89-93.

Kadlec K., Schwarz S. (2009) Identification of a novel ABC transporter gene, *vga(C)*, located on a multiresistance plasmid from a porcine methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 strain. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53: 3589-3591.

Kadlec K., Fessler A. T., Hauschild T., Schwarz S. (2012) Novel and uncommon antimicrobial resistance genes in livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin. Microbiol. Infect.* 18: 745-755.

Kehrenberg C., Werckenthin C., Schwarz S. (1998) Tn*5706*, a transposon-like element from *Pasteurella multocida* mediating tetracycline resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42: 2116-2118.

Kehrenberg C., Ojo K. K., Schwarz S. (2004) Nucleotide sequence and organization of the multiresistance plasmid pSCFS1 from *Staphylococcus sciuri*. *J. Antimicrob. Chemother.* 54: 936-939.

Kehrenberg C., Schwarz S. (2004) *fexA*, a novel *Staphylococcus lentus* gene encoding resistance to florfenicol and chloramphenicol. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48: 615-618.

Kehrenberg C., Schwarz S., Jacobsen L., Hansen L. H., Vester B. (2005) A new mechanism for chloramphenicol, florfenicol and clindamycin resistance: methylation of 23S ribosomal RNA at A2503. *Mol. Microbiol.* 57: 1064-1073.

Kehrenberg C., Schwarz S. (2006) Distribution of florfenicol resistance genes *fexA* and *cfr* among chloramphenicol-resistant *Staphylococcus* isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50: 1156-1163.

Kessie G., Ettayebi M., Haddad A. M., Shibl A. M., Al-Shammary F. J., Tawfik A. F., Al-Ahdal M. N. (1998) Plasmid profile and antibiotic resistance in coagulase-negative staphylococci isolated from polluted water. *J. Appl. Microbiol.* 84: 417-422.

Khan S. A., Novick R. P. (1983) Complete nucleotide sequence of pT181, a tetracycline-resistance plasmid from *Staphylococcus aureus*. *Plasmid* 10: 251-259.

Kloos W. E., Musselwhite M. S. (1975) Distribution and persistence of *Staphylococcus* and *Micrococcus* species and other aerobic bacteria on human skin. *Appl. Microbiol.* 30: 381-395.

Kloos W. E., Schleifer K. H., Smith R. F. (1976) Characterization of *Staphylococcus sciuri* sp. nov. and its subspecies. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 26: 22-37.

Kloos W. E. (1980) Natural populations of the genus *Staphylococcus*. *Annu. Rev. Microbiol.* 34: 559-592.

Kloos W. E., Orban B. S.. Walker D. D. (1981) Plasmid composition of *Staphylococcus* species. *Can. J. Microbiol.* 27: 271-278.

Kloos W. E., Bannerman T. L. (1994) Update on clinical significance of coagulase-negative staphylococci. *Clin. Microbiol. Rev.* 7: 117-140.

Kociánová S., Vuong C., Yao Y., Voyich J. M., Fischer E. R., DeLeo F. R., Otto M. (2005) Key role of poly-γ-DL-glutamic acid in immune evasion and virulence of *Staphylococcus epidermidis*. *J. Clin. Invest.* 115: 688-694.

Koura B. A., Badwy W., Zaghloul M. H. E., El Mashad N. (2007) Plasmid pattern analysis in slime-producing coagulase negative staphylococci in acute bacterial conjunctivitis, keratitis, chronic blepharitis and corneal ulcer. *Egypt. J. Med. Microbiol.* 16: 339-349.

Kresken M., Hafner D., Schmitz F. J., Wichelhaus T. A. (2004) Prevalence of mupirocin resistance in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*: results of the Antimicrobial Resistance Surveillance Study of the Paul-Ehrlich-Society for Chemotherapy, 2001. *Int. J. Antimicrob. Agents* 23: 577-581.

Kuntová L. (2006) Molekulární analýza plazmidů kmenů *Staphylococcus aureus* rezistentních k meticilinu. Diplomová práce, Masarykova univerzita, Brno, 75 s.

Kuntová L., Pantůček R., Rájová J., Růžičková V., Petráš P., Mašlaňová I., Doškař J. (2012) Characteristics and distribution of plasmids in a clonally diverse set of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Arch. Microbiol.* 194: 607-614.

Lacey R. W. (1975) Antibiotic resistance plasmids of *Staphylococcus aureus* and their clinical importance. *Bacteriol. Rev.* 39: 1-32.

LaMarre J., Mendes R. E., Szal T., Schwarz S., Jones R. N., Mankin A. S. (2013) The genetic environment of the *cfr* gene and the presence of other mechanisms account for the very high linezolid resistance of *Staphylococcus epidermidis* isolate 426-3147L. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57: 1173-1179.

Lange C. C., Werckenthin C., Schwarz S. (2003) Molecular analysis of the plasmid-borne *aacA/aphD* resistance gene region of coagulase-negative staphylococci from chickens. *J. Antimicrob. Chemother.* 51: 1397-1401.

Leelaporn A., Paulsen I. T., Tennent J. M., Littlejohn T. G., Skurray R. A. (1994) Multidrug resistance to antiseptics and disinfectants in coagulase-negative staphylococci. *J. Med. Microbiol.* 40: 214-220.

Leelaporn A., Firth N., Paulsen I. T., Hettiaratchi A., Skurray R. A. (1995) Multidrug resistance plasmid pSK108 from coagulase-negative staphylococci; relationships to *Staphylococcus aureus* qacC plasmids. *Plasmid* 34: 62-67.

Li J., Li B., Wendlandt S., Schwarz S., Wang Y., Wu C., Ma Z., Shen J. (2014) Identification of a novel *vga*(E) gene variant that confers resistance to pleuromutilins, lincosamides and streptogramin A antibiotics in staphylococci of porcine origin. *J. Antimicrob. Chemother.* 69: 919-923.

Lina G., Quaglia A., Reverdy M. E., Leclercq R., Vandenesch F., Etienne J. (1999) Distribution of genes encoding resistance to macrolides, lincosamides, and streptogramins among staphylococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43: 1062-1066.

Long K.S., Poehlsgaard J., Kehrenberg C., Schwarz S., Vester B. (2006) The Cfr rRNA methyltransferase confers resistance to phenicols, lincosamides, oxazolidinones, pleuromutilins, and streptogramin A antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50: 2500-2505.

Lozano C., Aspiroz C., Sáenz Y., Ruiz-García M., Royo-García G., Gómez-Sanz Elena, Ruiz-Larrea F., Zarazaga M., Torres C. (2012) Genetic environment and location of the *lnu*(A) and *lnu*(B) genes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and other staphylococci of animal and human origin. *J. Antimicrob. Chemother.* 67: 2804-2808.

Lüthje P., von Köckritz-Blickwede M., Schwarz S. (2007) Identification and characterization of nine novel types of small staphylococcal plasmids carrying the lincosamide nucleotidyltransferase gene *lnu(A)*. *J. Antimicrob. Chemother.* 59: 600-606.

Mack D., Fisher W., Krokotsch A., Leopold K., Hartmann R., Egge H., Laufs R. (1996) The intercellular adhesin involved in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* is a linear β-1,6-linked glucosaminoglycan: purification and structural analysis. *J. Bacteriol.* 178: 175-183.

Madhusoodanan J., Seo K. S., Remortel B., Park J. Y., Hwang S. Y., Fox L. K., Park Y. H., Deobald C. F., Wang D., Liu S., Daugherty S. C., Gill A. L., Bohach G. A., Gill S. R. (2011) An enterotoxin-bearing pathogenicity island in *Staphylococcus epidermidis*. *J. Bacteriol.* 193: 1854-1862.

Martineau F., Picard F. J., Grenier L., Roy P. H., Ouellette M., Bergeron M. G. (2000) Multiplex PCR assays for the detection of clinically relevant antibiotic resistance genes in staphylococci isolated from patients infected after cardiac surgery. *J. Antimicrob. Chemother.* 46: 527-534.

Matsuoka M., Endou K., Kobayashi H., Inoue M., Nakajima Y. (1997) A dyadic plasmid that shows MLS and PMS resistance in *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 148: 91-96.

McKenzie T., Hoshino T., Tanaka T., Sueoka N. (1987) Correction. A revision of the nucleotide sequence and functional map of pUB110. *Plasmid* 17: 83-85.

Molnàr C., Hevessy Z., Rozgonyi F., Gemmell C. G. (1994) Pathogenicity and virulence of coagulase negative staphylococci in relation to adherence, hydrophobicity, and toxin production in vitro. *J. Clin. Pathol.* 47: 743-748.

Moore J. E., Millar B. C., Crowe M., Buchanan J., Watabe M., Murphy P. G. (2003) Molecular determination of carriage of the *mecA* locus in coagulase negative *Staphylococci* in screening swabs from patients in an intensive care unit. *Mol. Pathol.* 56: 63.

Murphy E. (1985) Nucleotide sequence of a spectinomycin adenyltransferase AAD(9) determinant from *Staphylococcus aureus* and its relationship to AAD(3") (9). *Mol. Gen. Genet.* 200: 33-39.

Needham C., Rahman M., Dyke K. G., Noble W. C. (1994) An investigation of plasmids from *Staphylococcus aureus* that mediate resistance to mupirocin and tetracycline. *Microbiology* 140: 2577-2583.

Ng L. K., Martin I., Alfa M., Mulvey M. (2001) Multiplex PCR for the detection of tetracycline resistant genes. *Mol. Cell Probes* 15: 209-215.

Olsen J. E., Christensen H., Aarestrup F. M. (2006) Diversity and evolution of *blaZ* from *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. *J. Antimicrob. Chemother.* 57: 450-460.

O'Neill A. J., McLaws F., Kahlmeter G., Henriksen A. S., Chopra I. (2007) Genetic basis of resistance to fusidic acid in staphylococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51: 1737-1740.

Palazzo I. C. V., Araujo M. L. C., Darini A. L. C. (2005) First report of vancomycin-resistant staphylococci isolated from healthy carriers in Brazil. *J. Clin. Microbiol.* 43: 179-185.

Pantůček R., Švec P., Dajcs J. J., Machová I., Černohlávková J., Šedo O., Gelbíčová T., Mašlaňová I., Doškař J., Zdráhal Z., Růžičková V., Sedláček I. (2013) *Staphylococcus petrasii* sp. nov. including *S. petrasii* subsp. *petrasii* subsp. nov. and *S. petrasii* subsp. *croceilyticus* subsp. nov., isolated from human clinical specimens and human ear infections. *Syst. Appl. Microbiol.* 36: 90-95.

Perreten V., Giampa N., Schuler-Schmid U., Teuber M. (1998) Antibiotic resistance genes in coagulase-negative staphylococci isolated from food. *System. Appl. Microbiol.* 21: 113-120.

Projan S. J., Moghazeh S., Novick R. P. (1988) Nucleotide sequence of pS194, a streptomycin-resistance plasmid from *Staphylococcus aureus*. *Nucleic Acids Res.* 16: 2179-2187.

Rajan V., Kumar V. G., Gopal S. (2014) A cfr-positive clinical staphylococcal isolate from India with multiple mechanisms of linezolid-resistance. *Indian J. Med. Res.* 139: 463-467.

Ross J. I., Eady E. A., Cove J. H., Cunliffe W. J., Baumberg S., Wootton J. C. (1990) Inducible erythromycin resistance in staphylococci is encoded by a member of the ATP-binding transport super-gene family. *Mol. Microbiol.* 4: 1207-1214.

Sakinc T., Woznowski M., Ebsen M., Gatermann S. G. (2005) The surface-associated protein of *Staphylococcus saprophyticus* is a lipase. *Infect. Immun.* 73: 6419-6428.

Sedláček I. (2007) Taxonomie prokaryot, Masarykova univerzita, Brno, 270 s.

Schiwon K., Arends K., Rogowski K. M., Fürch S., Prescha K., Sakinc T., Van Houdt R., Werner G., Grohmann E. (2013) Comparison of antibiotic resistance, biofilm formation and conjugative transfer of *Staphylococcus* and *Enterococcus* isolates from international Space Station and Antarctic Research Station Concordia. *Microb. Ecol.* 65: 638-651.

Schleifer K. H., Kloos W. E. (1975) Isolation and characterization of staphylococci from human skin. I. Amended description of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus saprophyticus* and descriptions of three new species: *Staphylococcus cohnii*, *Staphylococcus haemolyticus*, and *Staphylococcus xylosus*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 25: 50-61.

Schnell N., Entian K. D., Schneider U., Götz F., Zähner H., Kellner R., Jung G. (1988) Prepeptide sequence of epidermin, a ribosomally synthesized antibiotic with four sulphide-rings. *Nature* 333: 276-278.

Schnellmann C., Gerber V., Rossano A., Jaquier V., Panchaud Y., Doherr M. G., Thomann A., Straub R., Perreten V. (2006) Presence of new *mecA* and *mph*(C) variants conferring antibiotic resistance in *Staphylococcus* spp. isolated from the skin of horses before and after clinic admission. *J. Clin. Microbiol.* 44: 4444-4454.

Schwarz S., Cardoso M., Blobel H. (1990) Detection of a novel chloramphenicol resistance plasmid from "equine" *Staphylococcus sciuri*. *J. Vet. Med. B* 37: 674-679.

Schwarz S., Cardoso M. (1991) Molecular cloning, purification, and properties of a plasmid-encoded chloramphenicol acetyltransferase from *Staphylococcus haemolyticus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 35: 1277-1283.

Schwarz S., Grölz-Krug S. (1991) A chloramphenicol-streptomycin resistance plasmid from a clinical strain of *Staphylococcus sciuri* and its structural relationships to other staphylococcal resistance plasmids. *FEMS Microbiol. Lett.* 66: 319-322.

Schwarz S., Noble W. C. (1994) Tetracycline resistence genes in staphylococci from the skin of pigs. *J. Appl. Bacteriol.* 76: 320-326.

Schwarz S., Roberts M. C., Werckenthin C., Pang Y., Lange C. (1998) Tetracycline resistance in *Staphylococcus* spp. from domestic animals. *Vet. Microbiol.* 63: 217-227.

Schwarz S., Werckenthin C., Kehrenberg C. (2000) Identification of a plasmid-borne chloramphenicol-florfenicol resistance gene in *Staphylococcus sciuri*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44: 2530-2533.

Schwarz S., Kehrenberg C., Ojo K. K. (2002) *Staphylococcus sciuri* gene *erm(33)*, encoding inducible resistance to macrolides, lincosamides, and streptogramin B antibiotics, is a product of recombination between *erm(C)* and *erm(A)*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46: 3621-3623.

Schwarz S., Kehrenberg C., Doublet B., Cloeckaert A. (2004) Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol. *FEMS Microbiol. Rev.* 28: 519-542.

Schwarz S., Fessler A. T., Hauschild T., Kehrenberg C., Kadlec K. (2011) Plasmid-mediated resistance to protein biosynthesis inhibitors in staphylococci. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1241: 82-103.

Shearer J. E. S., Wireman J., Hostetler J., Forberger H., Borman J., Gill J., Sanchez S., Mankin A., LaMarre J., Lindsay J. A., Bayles K., Nicholson A., O'Brien F., Jensen S. O., Firth N., Skurray R. A., Summers A. O. (2011) Major families of multiresistant plasmids from geographically and epidemiologically diverse staphylococci. *G3 (Bethesda)* 1: 581-591.

Shore A. C., Deasy E. C., Slickers P., Brennan G., O'Connell B., Monecke S. (2011) Detection of staphylococcal cassette chromosome *mec* type XI carrying highly divergent *mec*A, *mec*I, *mec*R1, *bla*Z, and *ccr* genes in human clinical isolates of clonal complex 130 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus. Antimicrob. Agents Chemother*. 55: 3765-3773.

Sidhu M. S., Oppengaard H., Evor T. P., Sørum H. (2007) Persistence of multidrug-resistant *Staphylococcus haemolyticus* in an animal veterinary teaching hospital clinic. *Microb. Drug. Resist.* 13: 271-280.

Sirot D., Sirot J., Labia R., Morand A., Courvalin P., Darfeuille-Michaud A., Perroux R., Cluzel R. (1987) Transferable resistance to third-generation cephalosporins in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*: identification of CTX-1, a novel β-lactamase. *J. Antimicrob. Chemother.* 20: 323-334.

Slonczewski J., Foster J. W. (2010) Microbiology: An Evolving Science (Second Edition). W. W. Norton & Company, New York. 1097 s.

Stegmann R., Perreten V. (2010) Antibiotic resistance profile of *Staphylococcus rostri*, a new species isolated from healthy pigs. *Vet. Microbiol.* 145: 165-171.

Strommenger B., Kettlitz C., Werner G., Witte W. (2003) Multiplex PCR assay for simultaneous detection of nine clinically relevant antibiotic resistance genes in *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* 41: 4089-4094.

Sugai M., Fujiwara T., Akiyama T., Ohara M., Komatsuzawa H., Inoue S., Suginaka H. (1997) Purification and molecular characterization of glycylglycine endopeptidase produced by *Staphylococcus capitis*. *J. Bacteriol*. 179: 1193-1202.

Takeuchi F., Watanabe S., Baba T., Yuzawa H., Ito T., Morimoto Y., Kuroda M., Cui L., Takahashi M., Ankai A., Baba S., Fukui S., Lee J. C., Hiramatsu K. (2005) Whole-genome sequencing of *Staphylococcus haemolyticus* uncovers the extreme plasticity of its genome and the evolution of human-colonizing staphylococcal species. *J. Bacteriol*. 187: 7292-7308.

Tenover F. C. (2006) Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *Am. J. Med.* 34: S3-S10.

Tewhey R., Gu B., Kelesidis T., Charlton C., Bobenchik A., Hindler J., Schork N. J., Humphries R. M. (2014) Mechanisms of linezolid resistance among coagulase-negative staphylococci determined by whole-genome sequencing. *MBio* 5: e00894-14.

Torres García M., Tejedor Junco M. T., Gonzáles Martín M., Gonzáles Lama Z. (1996) Selection of subpopulations resistant to amikacin and netilmicin of gentamicin-resistant clinical strains of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Zentralbl. Bakteriol.* 284: 58-66.

Toshkova K., Annemüller C., Lämmler C. (1999) Nasal carriage of *Staphylococcus haemolyticus* as risk factor for human infections. *Med. Sci. Res.* 27: 573-575.

Totten P. A., Vidal L., Baldwin J. N. (1981) Penicillin and tetracycline resistance plasmids in *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 20: 359-365.

Tristan A., Lina G., Etienne J., Vandenesh F. (2006) Biology and pathogenicity of staphylococci other than *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*, In: Fischetti V. A., Novick R. P., Ferretti J. J., Portnoy D. A., Rood J. I. (eds.), Gram-Positive Pathogens, 572-586, ASM Press, Washington, D. C.

Truong-Bolduc Q. C., Villet R. A., Estabrooks Z. A., Hooper D. C. (2014) Native efflux pumps contribute resistance to antimicrobials of skin and the ability of *Staphylococcus aureus* to colonize skin. *J. Infect. Dis.* 209: 1485-1493.

Tsubakishita S., Kuwahara-Arai K., Sasaki T., Hiramatsu K. (2010) Origin and molecular evolution of the determinant of methicillin resistance in staphylococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54: 4352-4359.

Valle J., Gomez-Lucia E., Piriz S., Goyache J., Orden J. A., Vadillo S. (1990) Enterotoxin production by staphylococci isolated from healthy goats. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 1323-1326.

Vignaroli C., Biavasco F., Varaldo P. E. (2006) Interactions between glycopeptides and beta-lactams against isogenic pairs of teicoplanin-susceptible and -resistant strains of *Staphylococcus haemolyticus*. *Antimicrob. Agents Chemother*. 50: 2577-2582.

Vitali L. A., Petrelli D., Lamikanra A., Prenna M., Akinkunmi E. O. (2014) Diversity of antibiotic resistance genes and staphylococcal cassette chromosome *mec* elements in faecal isolates of coagulase-negative staphylococci from Nigeria. *BMC Microbiol.* 14: 106.

Vuong C., Kociánová S., Voyich J. M., Yao Y., Fischer E. R., DeLeo F. R., Otto M. (2004a) A crucial role for exopolysaccharide modification in bacterial biofilm formation, immune evasion, and virulence. *J. Biol. Chem*. 279: 54881-54886.

Vuong C., Dürr M., Carmody A. B., Peschel A., Klebanoff S. J., Otto M. (2004b) Regulated expression of pathogen-associated molecular pattern molecules in *Staphylococcus epidermidis*: quorum-sensing determines pro-inflammatory capacity and production of phenol-soluble modulins. *Cell. Microbiol*. 6: 753-759.

Wang Y., He T., Schwarz S., Zhao Q., Shen Z., Wu C., Shen J. (2013) Multidrug resistance gene *cfr* in methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci from chickens, ducks, and pigs in China. *Int. J. Med. Microbiol.* 303: 84-87.

Watson D. C., Yaguchi M., Bisaillon J. G., Beaudet R., Morosoli R. (1988) The amino acid sequence of a gonococcal growth inhibitor from *Staphylococcus haemolyticus*. *Biochem. J.* 252: 87-93.

Wattal Ch., Raveendran R., Goel N., Oberoi J. K., Rao B. K. (2014) Ecology of blood stream infection and antibiotic resistance in intensive care unit at a tertiary care hospital in North India. *Braz. J. Infect. Dis.* 18: 245-251.

Wedley A. L., Dawson S., Maddox T. W., Coyne K. P., Pinchbeck G. L., Clegg P., Jamrozy D., Fielder M. D., Donovan D., Nuttall T., Williams N. J. (2014) Carriage of *Staphylococcus* species in the veterinary visiting dog population in mainland UK: molecular characterisation of resistance and virulence. *Vet. Microbiol.* 170: 81-88.

Wendlandt S., Fessler A. T., Monecke S., Ehricht R., Schwarz S., Kadlec K. (2013) The diversity of antimicrobial resistance genes among staphylococci of animal origin. *Int. J. Med. Microbiol.* 303: 338-349.

Werckenthin C., Cardoso M., Martel J. L., Schwarz S. (2001) Antimicrobial resistance in staphylococci from animals with particular reference to bovine *Staphylococcus aureus*, porcine *Staphylococcus hyicus*, and canine *Staphylococcus intermedius*. *Vet. Res.* 32: 341-362.

Willey J. M. (2011) Prescott's Microbiology. McGraw-Hill, New York. 1070 s.

Yazdankhah S. P., Asli A. W., Sørum H., Oppegaard H., Sunde M. (2006) Fusidic acid resistance, mediated by *fusB*, in bovine coagulase-negative staphylococci. *J. Antimicrob. Chemother.* 58: 1254-1256.

Yoshida H., Bogaki M., Nakamura S., Ubukata K., Konno M. (1990) Nucleotide sequence and characterization of the *Staphylococcus aureus norA* gene, which confers resistance to quinolones. *J. Bacteriol.* 172: 6942-6949.

Yu Z., Li J., Li Y., Wang Q., Zhai X., Wu G., Liu P., Li X. (2014) A *mer* operon confers mercury reduction in a *Staphylococcus epidermidis* strain isolated from Lanzhou reach of the Yellow River. *Int. Biodeter. Biodegr.* 90: 57-63.

Zmantar T., Kouidhi B., Miladi H., Bakhrouf A. (2011) Detection of macrolide and disinfectant resistance genes in clinical *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. *BMC Res. Notes* 4: 453.