MASARYKOVA UNIVERZITA
Přírodovědecká fakulta
Ústav experimentální biologie
Oddělení genetiky a molekulární biologie

Molekulární charakteristika ETA-konvertujících fágů izolovaných z klinických kmenů *Staphylococcus aureus*

Diplomová práce

Tibor Botka

VEDOUCÍ PRÁCE: doc. RNDr. Vladislava Růžičková, CSc.

Brno 2013

Bibliografický záznam

Autor:	Bc. Tibor Botka Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita Ústav experimentální biologie
Název práce:	Molekulární charakteristika ETA-konvertujících fágů izolovaných z klinických kmenů *Staphylococcus aureus*
Studijní program:	Experimentální biologie
Studijní obor:	Molekulární biologie a genetika
Vedoucí práce:	doc. RNDr. Vladislava Růžičková, CSc.
Akademický rok:	2012/2013
Počet stran:	100
Klíčová slova:	bakteriofág, exfoliativní toxin, *eta* gen, *Staphylococcus aureus*, genomová analýza, lyzogenní konverze

Bibliographic Entry

Author: Bc. Tibor Botka

Faculty of Science, Masaryk University
Department of Experimental Biology

Title of Thesis: Molecular characteristics of the ETA-converting phages isolated from clinical strains of *Staphylococcus aureus*

Degree Programme: Experimental Biology

Field of Study: Molecular biology and genetics

Supervisor: doc. RNDr. Vladislava Růžičková, CSc.

Academic Year: 2012/2013

Number of Pages: 100

Keywords: bacteriophage, exfoliative toxin, *eta* gene, *Staphylococcus aureus*, genomical analysis, lysogenic conversion

Abstrakt

Diplomová práce se zabývá genomovou analýzou a molekulární charakteristikou genomu dvou dosud nepopsaných stafylokokových *eta*-pozitivních bakteriofágů z čeledi *Siphoviridae,* které byly indukovány a izolovány z klinických kmenů *Staphylococcus aureus.* Součástí genomu těchto bakteriofágů je gen kódující exfoliativní toxin A, který je hlavním agens při vzniku epidermolytických onemocnění. Nejčastěji jsou jimi postiženi novorozenci a děti předškolního věku. Projevy stafylokokových epidermolytických onemocnění mohou být mírné s tvorbou lokalizovaných kožních lézí (bulózní impetigo), ale i generalizované život ohrožující stavy, projevující se narušením rozsáhlých ploch epidermis s možným rozvratem homeostázy (stafylokokový syndrom opařené kůže). Vznik ETA-pozitivních kmenů *Staphylococcus aureus* je usnadněn možností horizontálního přenosu genu *eta* prostřednictvím pozitivní lyzogenní konverze.

Abstract

This diploma thesis is focused on genomical analysis and molecular characterization of two previously undescribed staphylococcal *eta*-positive bacteriophages of the family *Siphoviridae.* These phages were induced and isolated from clinical strains of *Staphylococcus aureus*. Their genomes contain a gene encoding exfoliative toxin A, which is the main agent of developement of epidermolytic diseases. Newborns and young children are affected in most cases. Symptoms of staphylococcal epidermolytic diseases may be mild, when localized blisters and lesions are formed (bullous impetigo), but also generalized life-threatening conditions may appear (staphylococcal scalded skin syndrome). It manifests itself by disruption of the large areas of the epidermis and there is also a danger of collapse of homeostasis. Origin of ETA-positive strains of *Staphylococcus aureus* is eased by possibility of horizontal gene transfer by positive lysogenic conversion.

Vysoká škola: Masarykova univerzita **Fakulta:** přírodovědecká

Pracoviště: Ústav experimentální biologie **Akademický rok:** 2011/2012

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Magisterský studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární biologie a genetika

Student(ka): Bc. Tibor Botka

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 charakteristika ETA-konvertujících fágů izolovaných z klinických kmenů Staphylococcus aureus

Název tématu anglicky: Molecular characteristics of the ETA-converting phages isolated from clinical strains of Staphylococcus aureus

Vedoucí diplomové práce: doc. RNDr. Vladislava Růžičková, CSc

Jazyk práce: český (jiný jazyk jen na základě přiložené žádosti)

Zásady pro vypracování

Anotace: Závažné epidermolýzy postihující zejména novorozence a osoby se sníženou imunitou jsou způsobeny některými kmeny S. aureus produkujícími exfoliativní toxiny (ET) typu A a B. Geny pro ET jsou získávány vertikálním a horizontálním přenosem. Horizontální přenos genu kódujícího toxin ETA je zprostředkováván mírnými fágy, které neomezeně perzistují ve formě profágů v genomu bakterií. V průběhu koevoluce virů a bakterií dochází ke genetickým změnám, které jsou podmíněny genetickými vlastnostmi jak fágů, tak i hostitelských buněk. Výsledkem změn jsou nové virulentní kmeny a fágy, které představují závažný medicínský problém.

Cílem DP bude provést komparativní genomickou analýzu dvou typů dosud nepopsaných ETA-konvertujících stafylofágů izolovaných z klinických kmenů S. aureus. Na základě dosažených výsledků molekulární charakteristiky zhodnotit jejich roli v horizontální genomice, molekulární epidemiologii a evoluci kmenů S. aureus, zodpovědných za vznik hromadných výskytů epidermolýz v republikovém a celosvětovém měřítku.

Časový harmonogram řešení (postup): Zpracování literární rešerše – průběžně aktualizace nových poznatků k zadanému tématu
Metodika. Osvojení a využití postupů molekulárně biologických metod:
1.Izolace eta gen-pozitivních fágů typu B z vybraných klinických kmenů S. aureus .
2.Přenos genu eta a fágové konverze produkce toxinu ETA metodou makrorestrikční analýzy a RPLA.
3.Určení míry heterogenity izolovaných ETA fágů restrikční analýzou jejich DNA.
4.Analýza vybraných sekvencí genů nebo DNA segmentů, zvolených na základě jejich funkce a lokalizace ve fágových modulech. Naklonované a určené sekvence srovnat s odpovídajícími sekvencemi genomů eta-pozitivních fágů z databáze GenBank a jiných odborných prací.
5. Závěrečné zhodnocení role indukovaných ETA fágů v horizontální genomice a vliv profágů B na virulenci a evoluci kmenů S. aureus

Rozsah diplomové práce: 50 stran

Rozsah grafických příloh:

Doporučená literatura:
Stěžejní časopisy:
Antimicrobial Agents and Chemotherapy
Applied and Environmental Microbiology
Clinical Microbiology Reviews
Infection and Immunity
Journal of Bacteriology
Journal of Clinical Microbiology
Journal of Virology
Microbiology and Molecular Biology Reviews
Další literární zdroje z originálních publikací

Datum zadání diplomové práce: 16.11.2011

Termín odevzdání diplomové práce:
Termín odevzdání diplomové práce dle harmonogramu příslušného akademického roku.

V Brně dne 16.11.2011.

Bc. Tibor Botka
podpis studenta

doc. RNDr. Vladislava Růžičková, CSc
podpis vedoucího diplomové práce

prof. RNDr. Jan Šmarda, CSc.
ředitel ústavu

Poděkování

Na tomto místě bych rád poděkoval vedoucí mé diplomové práce doc. RNDr. Vladislavě Růžičkové, CSc. za cenné rady a doporučení při řešení zadané problematiky. Dále bych rád poděkoval všem pracovníkům Laboratoře molekulární diagnostiky mikroorganismů za jejich trpělivost a vstřícnost. Mé poděkování patří také pracovníkům Národní referenční laboratoře pro stafylokoky v Praze za ověření produkce ETA u lyzogenů.

Prohlášení

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

Brno 6. května 2013 .....

Tibor Botka

Obsah

Použité zkratky....11
1. ÚVOD....12
1.1. Charakteristika druhu *Staphylococcus aureus*....13
1.2. Stafylokoková onemocnění....14
1.2.1. Onemocnění způsobená exfoliativními toxiny....15
1.3. Exfoliativní toxiny produkované *Staphylococcus aureus*....17
1.3.1. Charakteristika exfoliativních toxinů ETA, ETB a ETD....18
1.3.2. Princip působení exfoliativních toxinů....19
1.3.3. Regulace exprese faktorů virulence....21
1.4. Genom *Staphylococcus aureus*....22
1.5. Stafylokokové fágy a profágy....22
1.5.1. Genom *eta*-pozitivních bakteriofágů....24
1.5.2. Mechanismus vzniku nových ET-pozitivních kmenů....26
1.6. Metody detekce a klasifikace *eta*-pozitivních fágů a kmenů *S. aureus*....27
2. CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE....29
3. MATERIÁL A METODY....30
3.1. Bakteriální kmeny a bakteriofágy....30
3.2. Materiál....32
3.2.1. Kultivační a uchovávací média....32
3.2.2. Enzymy....33
3.2.2.1. Restrikční štěpení....33
3.2.2.2. Klonování....34
3.2.2.3. Další používané enzymy....34
3.2.3. Materiál pro selekci transformovaných buněk *E. coli*....34
3.2.4. Materiál pro PCR....34
3.2.5. Elektroforéza....35
3.2.6. Chemikálie....35
3.3. Laboratorní přístroje a pomůcky....35
3.4. Počítačový software a internetové nástroje pro analýzu sekvencí....36
3.5. Metody....37
3.5.1. Izolace bakteriofága....37
3.5.1.1. Indukce excize profága....37
3.5.1.2. Stanovení titru kapkovou metodou....38
3.5.1.3. Izolace fága z jedné plaky....38
3.5.1.4. Příprava fágového lyzátu....39
3.5.1.5. Izolace fágové DNA fenol-chloroformovou metodou....39
3.5.2. Restrikční analýza bakteriofágové DNA....40
3.5.3. Elektroforéza v agarózovém gelu....41
3.5.4. PCR....41
3.5.4.1. Detekce fágových seroskupin....41
3.5.4.2. Detekce podskupin serologické skupiny B....42
3.5.4.3. Multiplex PCR detekce ETA-B skupin....44
3.5.4.4. PCR genotypizace....46
3.5.5. Klonování restrikčního fragmentu do vektoru pBluescript SK− 51
3.5.5.1. Příprava kompetentních buněk....51
3.5.5.2. Příprava plazmidového vektoru pBluescript SK− 52
3.5.5.3. Příprava vybraných restrikčních fragmentů ke klonování 52

3.5.5.4. Ligace vybraných restrikčních fragmentů s vektorem pBluescript SK−.....53
3.5.5.5. Transformace kompetentních buněk *E. coli* rekombinantní DNA 53
3.5.5.6. Příprava rekombinantní vektorové DNA k sekvenaci.....54
3.5.6. Sekvenace rekombinantní vektorové DNA a analýza dat 55
3.5.7. Lyzogenizace 55
3.5.7.1. Příprava hrubého buněčného lyzátu.....56
3.5.8. PFGE 57
4. VÝSLEDKY.....58
4.1. Izolace fágů ϕ236 a ϕ841.....58
4.2. Izolace DNA ϕ236 a ϕ841 60
4.3. Detekce seroskupin fágů metodou multiplex PCR.....60
4.4. Zařazení fágů ϕ236 a ϕ841 do ETA-B skupiny.....62
4.5. PCR genotypizace.....63
4.6. Analýza *Hin*dIII restrikčního spektra fágů ϕ236 a ϕ841.....66
4.7. Bioinformatická analýza 18. fragmentu *Hin*dIII restrikčního spektra fága ϕETA2. 68
4.8. PCR detekce sekvence ETA2-18.....69
4.9. Klonování vybraného fragmentu *Hin*dIII restrikčního spektra ϕ236.....71
4.9.1. Bioinformatická analýza 12. restrikčního fragmentu ϕ236.....72
4.9.2. Lokalizace genu pro integrázu v *Hin*dIII restrikčním spektru fágů.....77
4.10. Lyzogenizace netoxinogenního kmene *S. aureus* fágem ϕ236 a ϕ841.....79
5. Diskuze.....83
6. Závěr.....90
7. Summary.....91
LITERATURA.....92

Použité zkratky

AIP	Autoinducibilní peptid (Autoinducing peptide)
EDIN	Inhibitor diferenciace epidermálních buněk (Epidermal cell differentiation inhibitor)
EDTA	Etylendiaminotetraoctová kyselina (Ethylenediaminetetraacetic acid)
EGTA	Etylenglykoltetraoctová kyselina (Ethyleneglycoltetraacetic acid)
eta (gen)	Gen kódující exfoliativní toxin A
ETA	Exfoliativní toxin A (Exfoliative toxin A)
etb (gen)	Gen kódující exfoliativní toxin B
ETB	Exfoliativní toxin B (Exfoliative toxin B)
etc (gen)	Gen kódující exfoliativní toxin C
ETC	Exfoliativní toxin C (Exfoliative toxin C)
etd (gen)	Gen kódující exfoliativní toxin D
ETD	Exfoliativní toxin D (Exfoliative toxin D)
IPTG	Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside
LMDM	Laboratoř molekulární diagnostiky mikroorganismů
MGE	Mobilní genetické elementy (Mobile genetic elements)
MHC	Hlavní histokompatibilní komplex (Major histocompatibility complex)
MLST	Multilokusová sekvenční typizace (Multilocus sequence typing)
MRSA	Meticilin rezistentní *S. aureus* (Methicilin resistant *S. aureus*)
ORF	Otevřený čtecí rámec (Open reading frame)
PCR	Polymerázová řetězová reakce (Polymerase chain reaction)
PFGE	Pulzní gelová elektroforéza (Pulsed field gel electrophoresis)
RPLA	Reverzní pasívní latexová aglutinace (Reversed passive latex agglutination)
rpm	Otáčky za minutu (Revolutions per minute)
NRL SZÚ	Národní referenční laboratoř pro stafylokoky, Státní zdravotní ústav
SaPI	Stafylokokový ostrov patogenity (*S. aureus* pathogenicity island)
sea (gen)	Gen kódující stafylokokový enterotoxin A (staphylococcal enterotoxin A)
spa (gen)	Gen kódující povrchový protein A (surface protein A)
SSSS	Stafylokokový syndrom opařené kůže (Staphylococcal scalded skin syndrome)
TCR	Receptor T-lymfocytů (T-cell receptor)
TSS	Syndrom toxického šoku (Toxic shock syndrome)
TSST	Toxin syndromu toxického šoku (Toxic shock syndrome toxin)
X-gal	X-galaktóza

1. ÚVOD

Staphylococcus aureus patří mezi nejúspěšnější lidské patogeny. Způsobuje široké spektrum onemocnění od menších kožních infekcí až po životu nebezpečné systémové infekce a toxikózy. Stafylokokové infekce neustále nabývají na významu především v nemocničním prostředí, kde se často uplatňují multirezistentní kmeny. *S. aureus* rychle kolonizuje různé povrchy, včetně nemocničních nástrojů, zdravotních pomůcek a stejně tak se šíří i kontaktem pacientů a personálu. Jeho výjimečná virulence je způsobena řadou povrchových a extracelulárních proteinů, které bakterii usnadňují vstup do hostitelského organismu a její další šíření. Zejména u imunodeficientních pacientů způsobují vleklé sekundární infekce.

Mezi extracelulární proteiny patří také exfoliativní toxiny (exfoliatiny), zodpovědné za několik typů epidermolytických onemocnění. Nejčastěji jsou jimi postiženi novorozenci a děti předškolního věku. Exfoliatiny produkuje jen asi 5% klinických kmenů, nicméně průběh zejména generalizované formy onemocnění může být velmi závažný. V nejtěžších případech je třeba nasadit podpůrnou antibiotickou léčbu.

Vznik nových kmenů produkujících exfoliatiny je usnadněn horizontálním přenosem genů, který je zprostředkován mobilními genetickými elementy. Gen kódující exfoliatin A (ETA) je přenášen bakteriofágy z čeledi *Siphoviridae* prostřednictvím lyzogenní konverze.

Tato diplomová práce má za cíl provést komparativní genomickou analýzu dvou typů ETA-konvertujících bakteriofágů, které byly izolovány z klinických kmenů *S. aureus*. Na základě získaných výsledků pak zhodnotit jejich význam v horizontální genomice a evoluci kmenů *S. aureus*.

1.1. Charakteristika druhu *Staphylococcus aureus*

Stafylokoky jsou velmi rozšířené mikroorganismy zahrnující jak primárně patogenní, tak komenzální druhy. Ty se běžně vyskytují na kůži a povrchu sliznic ptáků a savců jako součást normální mikroflóry, avšak za určitých podmínek mohou způsobovat oportunní infekce. Stafylokoky poprvé pozoroval francouzský mikrobiolog Louis Pasteur a skotský lékař a amatérský mikrobiolog Alexander Ogston v roce 1880.

Bakterie rodu *Staphylococcus* lze charakterizovat jako grampozitivní koky. V mikroskopickém obrazu tvoří buňky převážně hroznovité shluky (z řečtiny hrozen, *staphylé*), ale mohou být uspořádány i jednotlivě, v párech, tetrádách nebo krátkých řetízcích po čtyřech. Stafylokoky jsou nepohyblivé a nesporulující.

Většina druhů je fakultativně anaerobní, katalázapozitivní a oxidázanegativní. Jsou citlivé k lysostafinu a furazolidinu a naopak rezistentní na bacitracin a lysozym. Význačnou vlastností rodu *Staphylococcus* je růst při 10% koncentraci NaCl, čehož se využívá při jeho izolaci. Fermentuje manitol a glukózu. *S. aureus* patří mezi koagulázapozitivní druhy, produkuje volnou i vázanou koagulázu. Na živném agaru tvoří žlutooranžově zbarvené kolonie.

Taxonomicky patří *S. aureus* do říše *Eubacteria*, kmene *Firmicutes*, třídy *Bacilli*, řádu *Bacillales*, čeledi *Staphylococcaceae*, rodu *Staphylococcus*. Existují dva poddruhy *S. aureus*: *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* a *Staphylococcus aureus* subsp. *anaerobius*. Druhý jmenovaný se u člověka nevyskytuje. Naproti tomu *S. aureus* subsp. *aureus* patří mezi nejdůležitější a nejúspěšnější lidské patogeny.

V rodu *Staphylococcus* existuje v současnosti 47 různých druhů, přičemž deset z nich má dva poddruhy a jeden má poddruhy čtyři (Euzéby, 2013).

Druh *S. aureus* je přenášen přibližně jednou třetinou lidské populace bez jakýchkoliv příznaků.. Tento mikrob kolonizuje nejčastěji povrch kůže v oblasti axil, nozder, vulvy a hráze, dále slizniční povrch v nosní dutině, krku, vaginální stěně a gastrointestinálním traktu (Wertheim *et al.*, 2004). Až 20 % lidí je trvale a 30 % dočasně kolonizováno v oblasti nosu, odkud dochází nejčastěji k šíření v rámci jedince i populace.

Ke vzniku stafylokokových infekcí predisponují poranění, virové infekce, *diabetes mellitus* a různé imunodeficience (Laupland *et al.*, 2003). Proniknutí do organismu a šíření

v jeho prostředí je umožněno četnými faktory virulence, které lze dělit na povrchové a extracelulární.

Povrchové faktory způsobují uvolnění cytokinů, aktivaci komplementu, shlukování trombocytů a vazbu s Fc fragmenty imunoglobulinů, čímž chrání bakteriální buňku před fagocytózou. Patří sem stafylokokový peptidoglykan, protein A a vázaná koaguláza, tzv. *clumping factor*. Důležitou funkcí faktorů vázajících se na kolagen, elastin či fibronektin, je adheze na tkáňové povrchy.

Extracelulární faktory virulence zahrnují enzymy a toxiny. K enzymům patří koaguláza, hyalurodináza, kataláza (volná), lipázy, nukleázy, fibrinolyzin a penicilináza. Jejich účinkem, tj. rozrušováním buněčných struktur, dochází k šíření stafylokoků tkáněmi. Penicilináza inaktivuje beta-laktamová antibiotika a volná koaguláza indukuje konverzi fibrinogenu na fibrin.

Stafylokokové toxiny zahrnují toxin syndromu toxického šoku, enterotoxiny, exfoliativní toxiny a cytolyziny. Enterotoxiny a toxin syndromu toxického šoku (TSST-1) jsou superantigeny způsobující nadměrnou imunitní reakci. Nespecificky se váží na MHC třídy II antigen prezentujících buněk a na TCR T-lymfocytů (Choi *et al.*, 1989). Aktivují 5 – 30 % T-lymfocytů a indukují jejich nespecifickou proliferaci. Výsledkem je nadprodukce cytokinů způsobujících stav šoku. Exfoliativní toxiny působí proteolyticky na dezmozomální glykoprotein desmoglein 1 (Amagai *et al.*, 2000). Důsledkem je odloučení keratinocytů v granulární vrstvě pokožky. Cytolyziny poškozují buněčné membrány a jsou zodpovědné za tkáňová poškození v průběhu infekce. Ochranu před neutrofily a makrofágy poskytuje stafylokokům Pantonův-Valentinův leukocidin (Genestier *et al.*, 2005). Tento toxin je příčinou závažných kožních infekcí a nekrotizující pneumonie.

1.2. Stafylokoková onemocnění

Onemocnění způsobená *S. aureus* mohou být hnisavá, kdy postihují kůži a její adnexa (folikulitida, hordeolum, furunkl), nebo vnitřní orgány (např. endokarditida, pneumonie či osteomyelitida) (McCaig *et al.*, 2006). Mnohá onemocnění jsou spojena s produkcí toxinů. Syndrom toxického šoku (TSS) je systémové multiorgánové onemocnění. Projevuje se vysokou teplotou, hypotenzí, odlupováním kůže, průjmem a zvracením. Existuje menstruální a nemenstruální forma. Onemocnění je způsobeno stafylokokovými exotoxiny,

menstruální forma pak výhradně TSST-1 (Schlievert *et al.*, 2010). Enterotoxiny jsou příčinou alimentárních toxikóz, které se projevují nevolností, zvracením a břišními křečemi (Holečková *et al.*, 2002). Dosud ne zcela objasněným mechanismem způsobují stafylokokové superantigeny i Kawasakiho syndrom, což je akutní multisystémový zánět cév (Kato *et al.*, 1996). Až v 25 % neléčených případů způsobuje aneuryzmata koronárních artérií. Projevem je horečka, vyrážka, zánět sliznic úst a očí, odlupování kůže kolem nehtů a postižení lymfatických uzlin. Superantigen TSST-1 je pravděpodobně odpovědný i za atopickou dermatitidu (Lester *et al.*, 1995). Tu vyvolávají kmeny z vlastní přirozené mikroflóry. Pro onemocnění je typická zvýšená koncentrace IgE a abnormální funkce T-lymfocytů.

1.2.1. Onemocnění způsobená exfoliativními toxiny

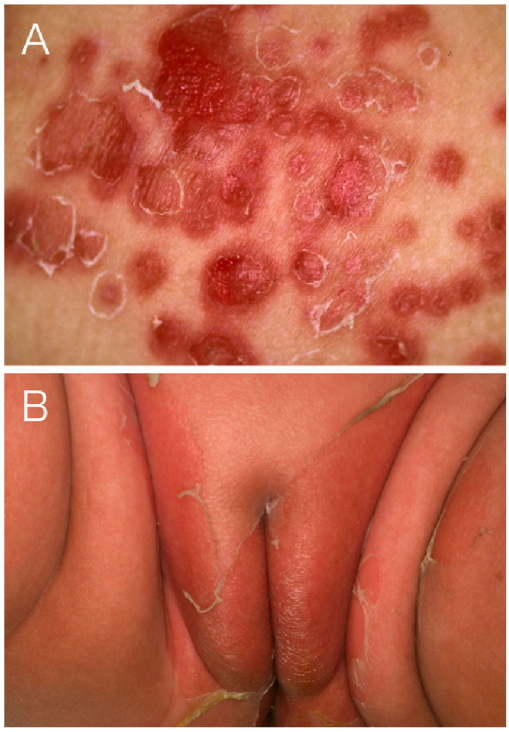
Kmeny produkující exfoliativní toxiny mohou vyvolat toxickou epidermolýzu (obr. 1; Nishifuji *et al.*, 2008). Stafylokokový syndrom opařené kůže (SSSS), též známý jako Ritterova choroba, je generalizované a vysoce nakažlivé onemocnění. Postihuje zejména děti mladší pěti let (Jeyakumari *et al.*, 2009). U dospělých jedinců se většinou jedná o sekundární onemocnění zapříčiněné sníženou imunitou, např. u pacientů s chronickým selháním ledvin, nebo s onemocněním AIDS. U dětí se mortalita pohybuje pod 5 %, u dospělých pacientů dosahuje až 60 %.

SSSS se projevuje zarudnutím kůže, tvorbou puchýřů, odlučováním vrchní vrstvy epidermis, dehydratací a horečkou (Ladhani *et al.*, 1999). Zasahuje rozsáhlé oblasti povrchu těla. Tekutina v puchýřích bývá sterilní. Předpokládá se tedy, že se toxin šíří krví ze vzdáleného ložiska, např. z nosohltanu. Lokalizovaná forma onemocnění se u starších dětí a dospělých nazývá bulózní impetigo, u novorozenců se označuje jako *pemphigus neonatorum*. Je omezena pouze na oblast infekce, nicméně etiologie a projevy jsou obdobné jako u SSSS. Léčba nekomplikovaných případů se provádí antibiotiky a trvá zhruba deset dní (Cole a Gazewood, 2007). Používá se především lokální antibiotikum mupirocin. V případě závažnějších projevů se nasazují orální antibiotika: amoxicilin, cefalosporin, antistafylokokové peniciliny a makrolidy.

Vzhledem k narušeným funkcím kůže hrozí komplikace v podobě sekundárních infekcí, poruch homeostázy (zejména elektrolytická nerovnováha) a u novorozenců také poruchy kontroly tělesné teploty (Cole a Gazewood, 2007).

Příčina výrazně vyššího výskytu SSSS u novorozenců oproti ostatním věkovým skupinám pravděpodobně spočívá v nižší glomerulární filtrační schopnosti ledvin novorozenců (Ladhani *et al.*, 1999). Koncentrace toxinů v krvi tak dosahuje vyšších hodnot a její pokles je naopak velmi pomalý.

Obrázek 1: Klinická manifestace bulózního impetiga a SSSS (Nishifuji *et al.*, 2008)



(A) Pacient s bulózním impetigem – splývající, kruhovité a strupovité kožní eroze

(B) Novorozenec s generalizovaným SSSS – rozsáhlé odlupování pokožky v genitální oblasti

Přítomnost mateřských protilátek v krvi novorozenců má ochrannou funkci proti stafylokokovým epidermolýzám (Machida, 1995). Protilátky proti exfoliativním toxinům byly zjištěny v 88 % vzorků pupečníkové krve, přičemž takto chránění novorozenci bývají postiženi spíše méně závažnými lokálními formami epidermolýz (Ladhani *et al.*, 1999).

Stafylokokové epidermolýzy u dospělých jedinců jsou vzácné a téměř vždy souvisí se sníženou imunitou nebo zhoršenou funkcí ledvin (Mulligan *et al.*, 1993). Lamand *et al.* (2012) zpracovali retrospektivní studii, která udává pět případů SSSS a deset případů bulózního impetiga u dospělých pacientů bez zmíněných rizikových faktorů z celkem 349 případů stafylokokových epidermolytických onemocnění na území Francie během deseti let.

Incidence infekčních onemocnění novorozenců způsobených *S. aureus* se již několik

desítek let zvyšuje (Sarlangue *et al.*, 1998). V roce 2003 proběhla v USA retrospektivní studie, která potvrdila také výrazný nárůst případů SSSS u novorozenců během dvou let (Faden, 2003). Naopak na území Francie byl počet případů stafylokokových epidermolýz mezi roky 1997 – 2007 stabilní (Lamand *et al.*, 2012). V nemocničním prostředí je důležitým epidemiologickým rizikovým faktorem asymptomatické nosičství ET-pozitivních kmenů, zejména u ošetřujícího perzonálu. Roli v přenosu z dítěte na dítě hraje i využívání společného vybavení, např. přebalovacích pultů (El Helali *et al.,* 2005; Kaplan *et al.*, 1986).

1.3. Exfoliativní toxiny produkované *Staphylococcus aureus*

Mechanismus působení *S. aureus* v patogenezi SSSS nebyl znám až do roku 1967, kdy byla zveřejněna teorie o hypotetickém toxinu. Jeho existence byla následně potvrzena v roce 1972 indukcí tvorby puchýřů sterilním filtrátem bakteriální kultury (Lyell, 1967; Melish *et al.*, 1972). O několik let později byly identifikovány dva sérotypy: ETA a ETB (Kondo *et al.*, 1974; Wiley a Rogolsky, 1977).

ETA je dominantní exfoliativní toxin (ET) v Evropě a USA, zatímco ETB především v Japonsku (Ladhani *et al.*, 1999). Bylo zjištěno, že nejčastěji se vyskytujícím izolátem souvisejícím s SSSS jsou kmeny *S. aureus* produkující ETB. V případě bulózního impetiga však výrazná převaha jednoho ze sérotypů zjištěna nebyla (Yamasaki *et al.*, 2005). Dosud nebyla odhalena souvislost mezi sérotypem ET a regionálními rozdíly či klinickým projevem onemocnění.

V letech 1998 až 2011 bylo analyzováno 730 ET-pozitivních kmenů *S. aureus* z České a Slovenské republiky odpovědných za propuknutí nozokomiálních epidermolytických infekcí v několika porodnicích (Růžičková *et al.*, 2012). Z těchto kmenů 78,6 % produkovalo ETA, 4,4 % ETB a 17 % oba toxiny současně. Francouzská studie provedla detekci genů pro ET u 283 klinických kmenů (Lamand *et al.*, 2012). Všechny kmeny produkovaly alespoň jeden typ exfoliatinu, 36 % kmenů neslo jen gen *eta*, 10 % jen gen *etb* a 54 % neslo oba geny.

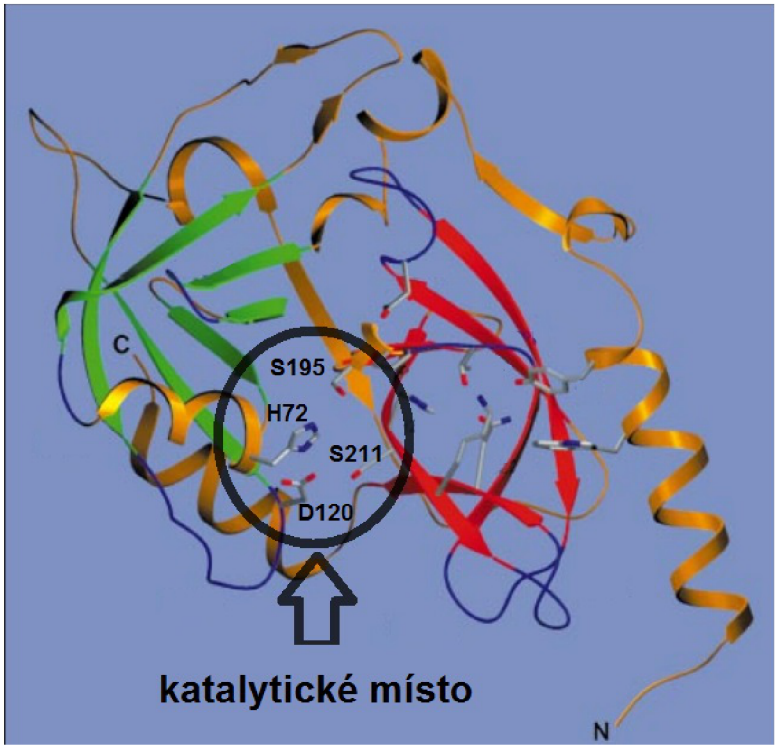
Jsou známy i další dva sérotypy: ETC a ETD. ETC byl izolován z rány koně postiženého flegmónou (Sato *et al.*, 1994). Z hlediska humánní medicíny není významný. ETD byl objeven pomocí genové analýzy kmene *S. aureus*, který byl izolován od pacienta s kožním poraněním (Yamaguchi *et al.*, 2002).

1.3.1. Charakteristika exfoliativních toxinů ETA, ETB a ETD

Exfoliatiny jsou exotoxiny patřící mezi serinové proteázy (Ladhani *et al.*, 1999). ETA je termostabilní protein, který se skládá ze 242 aminokyselin a má molekulovou hmotnost 26,9 kDa. ETB je naopak termolabilní protein s molekulovou hmotností 27,3 kDa a je složený ze 246 aminokyselin. Aminokyselinové řetězce obou toxinů jsou identické zhruba ze 41 %. Aminokyselinový řetězec ETD je s ETA identický ze 40 % a s ETB z 59 % (Yamaguchi *et al.*, 2002). Peptidový řetězec ETD se skládá ze 281 aminokyselin a má molekulovou hmotnost 27 kDa. Struktura ETA je zachycena na obrázku 2 (Cavarelli *et al.*, 1997). Katalytické místo se nachází mezi dvěma doménami podobné struktury.

Sekvence aminokyselin ETA a ETB se velmi podobají stafylokokové proteáze V8 (Ladhani *et al.*, 1999). Analýzou krystalické struktury byla odhalena aktivní část, tzv. katalytická triáda histidin-aspartát-serin. Její důležitost byla demonstrována zaměněním katalytického serinu u ETA za cystein nebo glycin, což se při naočkování novorozené myši projevilo ztrátou exfoliativní funkce. K exfoliatinům jsou citlivé myši, opice a lidé, zatímco kuřata, morčata, králíci a krysy jsou na jejich účinky necitlivé (Amagai *et al.*, 2000).

Obrázek 2: Schématické znázornění struktury ETA (Cavarelli *et al.*, 1997; upraveno)



Struktura je typická pro serinové proteázy. Doména I je označena zeleně, doména II červeně.

1.3.2. Princip působení exfoliativních toxinů

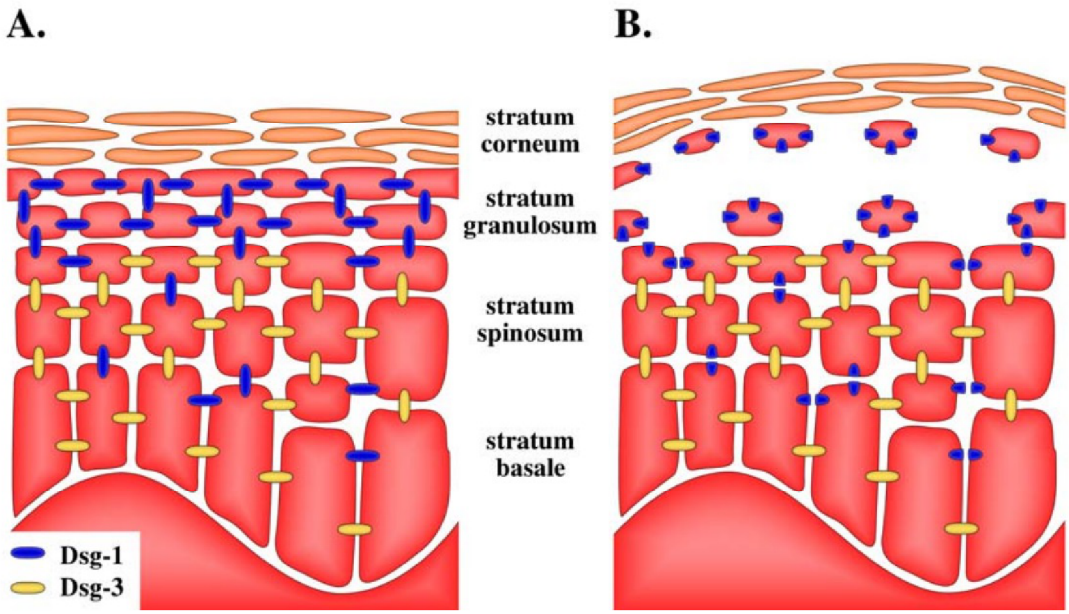
Mechanismus, jakým exfoliatiny způsobují epidermolytická onemocnění, byl dlouhou dobu neznámý. Průlom nastal v roce 2000, kdy byly pozorovány podobnosti mezi SSSS a autoimunitním onemocněním *pemphigus foliaceus* (Amagai *et al.*, 2000). Při tomto onemocnění protilátky typu IgG narušují mezibuněčnou soudržnost keratinocytů štěpením dezmozomálního kadherinu - desmogleinu 1 (Eyre a Stanley, 1987). Výsledkem je tvorba puchýřů (obr. 3; Bukowski *et al.*, 2010).

Podobnost klinické manifestace a histopatologie obou onemocnění vedla k myšlence, že i molekulární podstata jejich vzniku bude obdobná (Amagai, 2003; Stanley a Amagai, 2006). U člověka se vyskytují čtyři isoformy desmogleinu: Dsg1, Dsg2, Dsg3, Dsg4, které se liší svým zastoupením v jednotlivých vrstvách tkáně (Shirakata, 1998). V lidské epidermis jsou to především Dsg1 a Dsg3.

Fakt, že SSSS postihuje jen svrchní vrstvu pokožky a nikoliv její hlubší vrstvy, lze vysvětlit distribucí Dsg isoforem (Arnemann *et al.*, 1993). Exfoliatiny hydrolyzují výhradně Dsg1, zatímco Dsg3 zůstává neporušen. Dsg1 je zastoupen rovnoměrně ve všech vrstvách epidermis. Dsg3 se vyskytuje v hlubších částech, tj. *stratum basale* a *stratum spinosum*. Pokud tedy dojde k rozkladu Dsg1, není ve vrchních částech žádná další isoforma, která by kompenzovala ztrátu funkce Dsg1. Dochází tak k odlučování keratinocytů na úrovni *stratum granulosum* (obr. 3; Bukowski *et al.*, 2010).

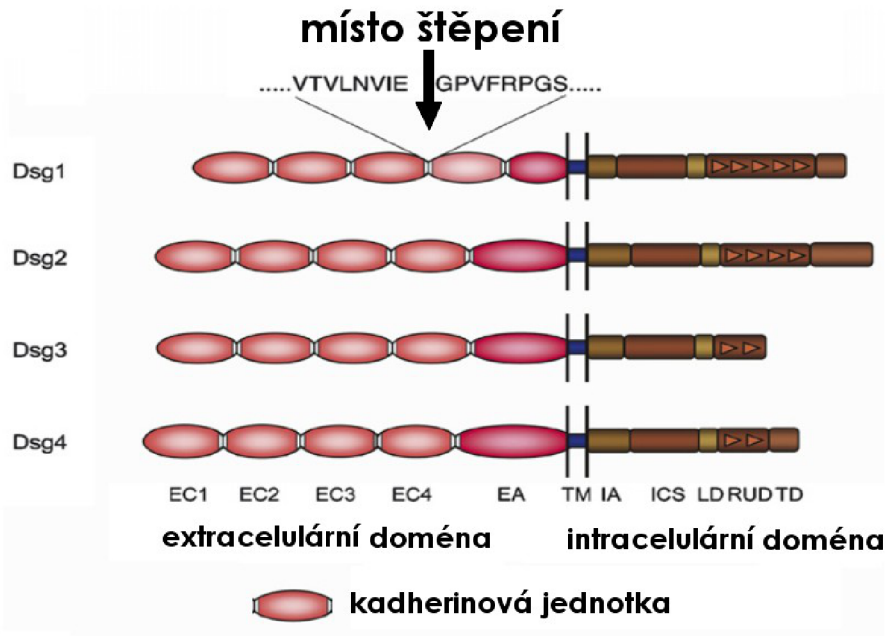
Desmoglein 1 patří mezi dezmozomové kadheriny a přispívá k udržení mezibuněčných spojů. Jeho extracelulární část se skládá ze čtyř kadherinových jednotek (EC). Po *in vitro* inkubaci rekombinantních extracelulárních domén lidského Dsg1 s exfoliativními toxiny dochází ke štěpení Dsg1 na dva peptidové řetězce o velikosti 30 a 50 kDa (Hanakawa *et al.*, 2002). Tato skutečnost dokazuje, že ke štěpení dochází v jednom konkrétním místě (obr. 4; Nishifuji *et al.*, 2008). Toto místo se nachází za zbytkem kyseliny glutamové 381, mezi EC3 a EC4 (Hanakawa a Stanley, 2004). Oblast štěpení je stejná i u myšího Dsg1, a to v případě ETA, ETB i ETD. Ostatní příbuzné kadheriny, jako Dsg3 a E-kadherin štěpeny nejsou. Pro navázání ETA na lidský Dsg1 je klíčových pět aminokyselin v EC3, lokalizovaných 110 zbytků od místa štěpení (Hanakawa *et al.*, 2004). Tyto aminokyseliny pravděpodobně zpřístupňují katalytickou triádu ETA. Molekula Dsg1 je stabilizována Ca^{2+} ionty, přičemž jejich odčerpání způsobí nemožnost připojení ET na substrát.

Obrázek 3: Různé zastoupení izoforem desmogleinu v epidermis (Bukowski *et al*., 2010)



(A) Schématické znázornění distribuce desmogleinu ve zdravé pokožce a (B) v pokožce vystavené exfoliativním toxinům.

Obrázek 4: Molekulární struktura čtyř izoforem lidského desmogleinu (Nishifuji *et al*., 2008; upraveno)



Extracelulární doména se skládá ze čtyř kadherinových jednotek (EC1–EC4) a extracelulární kotvící domény (EA). Intracelulární doménu tvoří intracelulární kotvící doména (IA), intracelulární segmentová doména kadherinového typu (ICS), spojovací doména (LD), repetiční doména (RUD) a terminální doména (TD)

1.3.3. Regulace exprese faktorů virulence

Regulací genů může *S. aureus* modifikovat tvorbu povrchových faktorů i exotoxinů podle vnějších i vnitřních podmínek (Chan a Foster, 1998). To mu umožňuje rychlou adaptaci se všemi klinickými důsledky. Zatímco v exponenciální fázi růstu jsou produkovány především povrchové faktory, ve stacionární fázi převažuje tvorba exotoxinů (Lowy, 1998). Je tak zajištěna produkce molekul pro zachycení a rozrušení tkání po vstupu patogenu do hostitelského organismu. Po kolonizaci následuje produkce exotoxinů, umožňujících další šíření.

Faktory virulence jsou regulovány dvou-komponentovými regulačními systémy (*agrCA, saeRS, arlRS*) a globálními regulátory (*sarA, sarS, sigB*) (Kato *et al.*, 2011). Lokus *agr* má dva různé transkripty, RNA II a RNA III. Proteiny kódované RNA II regulují produkci AIP, což je signální peptid, uplatňující se v systémech populační hustoty (quorum-sensing). RNA III je efektorová molekula *agr* systému, která ovlivňuje expresi přibližně 130 genů, včetně *eta* a *etb*, ale i dalších genů pro superantigeny, cytotoxiny a proteázy (Kuroda *et al.*, 2001). K expresi RNAIII dochází v pozdní logaritmické a stacionární fázi růstu, kdy pozitivně ovlivňuje transkripci genů pro extracelulární proteiny. Povrchové faktory jsou naopak inhibovány (Novick *et al.*, 1993).

Díky polymorfizmu genů *agr* systému se rozlišují čtyři skupiny, které se navzájem inhibují (Ji *et al.*, 1997). Většina kmenů produkujících exfoliatiny náleží do čtvrté skupiny (Jarraud *et al.*, 2000). *Sar* systém reguluje expresi faktorů virulence v závislosti na růstové fázi. V regulaci exprese exfoliatinů se uplatňují dva jeho produkty, SarA a SarS (Tegmark *et al.*, 2000). Tyto transkripční faktory působí přímo, navázáním na promotor cílového genu, nebo nepřímo, regulací ostatních systémů. SaeRS systém je pozitivní transkripční regulátor produkce exoproteinů závislý na *agr* a SarA (Giraudo *et al.*, 1997). ArlRS systém pozitivně reguluje *agr* systém a podílí se na regulaci tvorby biofilmu, extracelulární proteolytické činnosti a regulaci autolýzy (Fournier a Hooper, 2000). SigB se uplatňuje především v regulaci odpovědi na stres (Deora *et al.*, 1997). Tvorbu faktorů virulence reguluje přímo prostřednictvím vazby na σ^B-dependentní promotor cílového genu, nebo nepřímo skrze globální regulátory, včetně sarA a sarS. Exprese *eta* a *etb* je, *in vivo* a *in vitro*, pozitivně regulována *saeRS*, *arlRS* a *agrCA* (Kato *et al.*, 2011). Exprese *eta* je negativně regulována systémy *sarA*, *sarS* a *sigB*. Exprese *etb* je negativně regulována pomocí *sigB* a *sarA*, vliv *sarS* je velmi malý a projevil se jen *in vitro*.

1.4. Genom *Staphylococcus aureus*

Dosud je kompletně dokončena sekvenace genomu 33 kmenů *S. aureus* (NCBI Genome, 2013). Hlavní částí genomu je kružnicový chromozom o velikosti 2,69 až 3,08 Mbp, obsah G + C je 32,4 % až 33 %. Celkem obsahuje zhruba 2700 sekvencí, některé kódují proteiny, jiné představují matrici pro strukturní a regulační RNA (Baba *et al.*, 2008).

Celkový genom je tvořen konzervativními (jádrovými) geny, přídavnými elementy a pravidelně se vyskytujícími variabilními geny, tzv. „core variable“ (CV) geny. Stabilní geny tvoří asi 75 % z celkového genomu. Jádrové geny jsou vysoce konzervativní a jednotlivé geny dosahují 98 až 100% identity napříč kmeny. Jejich funkce je spojena s centrálním metabolismem a základními funkcemi buňky. CV je skupina 723 genů, pomocí kterých lze kmeny dělit do několika vývojových linií (Feil *et al.*, 2003).

Přídavná složka zaujímá až 25 % genomu. Tvoří ji mobilní genetické elementy (MGE), tj. plazmidy, transpozony, profágy, ostrovy patogenity a stafylokokové chromozomové kazety (Lindsay a Holden, 2004). MGE mohou být přenášeny mezi kmeny a udílet jim rezistenci či virulenci.

1.5. Stafylokokové fágy a profágy

Stafylokokové bakteriofágy patří do řádu *Caudovirales* a nejčastěji do čeledi *Siphoviridae*. Jedná se zejména o mírné (temperované) fágy s bičíkem. Bakteriofágy S. *aureus* jsou, na základě antigenních vlastností kapsidových proteinů a bičíkových vláken, členěny do 7 serologickych skupin: A, B, C, D, F, G, L. Pro variabilitu bakteriálního genomu jsou nejdůležitější mírné fágy ze skupin A, B a F (Goerke *et al.*, 2009).

Začleněním DNA bakteriofága do genomu bakterie vzniká profág, který se pak dále replikuje jako součást chromozomu, a přitom nezasahuje do základních životních funkcí stafylokoků. Profágy *S. aureus* můžeme rozdělit do tří skupin podle velikosti genomu (Kwan *et al.*, 2005). První skupina zahrnuje profágy s velikostí genomu pod 20 kb, druhá skupina má velikost genomu kolem 40 kb a třetí pak více než 125 kb.

Profágy hrají významnou roli v evoluci a patogenitě *S. aureus.* Mnoho profágů nese geny pro faktory virulence, jako např. pro enterotoxiny A, G, K, exfoliatin A, či

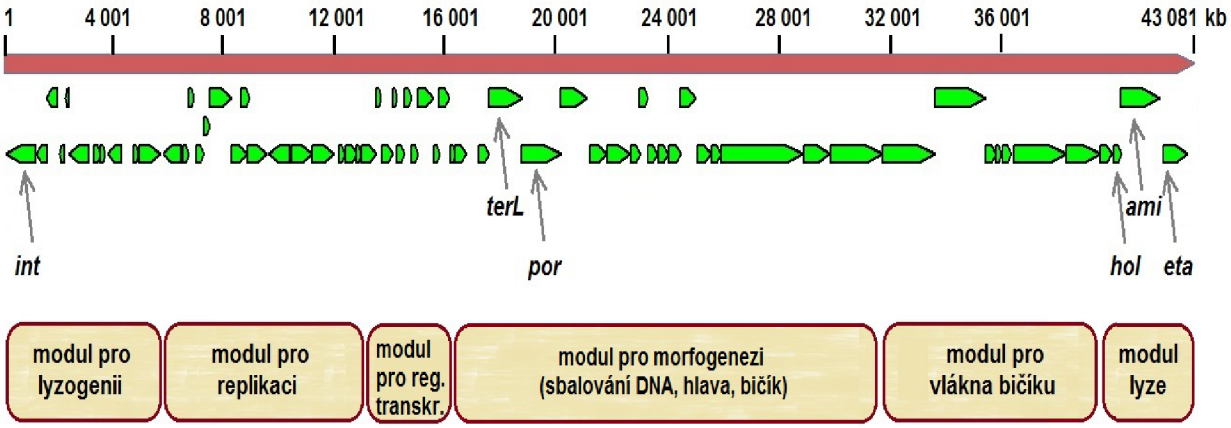
Pantonův-Valentinův leukocidin (Lindsay a Holden, 2004). Profágy se podílejí na vysoké variabilitě genomu stafylokoků, na změnách jejich fenotypu a virulence.

Při negativní konverzi je DNA fága integrována přímo do některého z bakteriálních genů a může dojít k jeho inzerční inaktivaci. Konverze však může být i pozitivní, kdy dochází k expresi genu pro faktory virulence, např. gen *sea* pro enterotoxin A a gen *sak* pro stafylokinázu (Goerke *et al.*, 2009).

Pozoruhodnou vlastností profágů je jejich modulární struktura a mozaikovitost (obr. 5), která je výsledkem procesů rekombinace, horizontálního přenosu DNA sekvencí a selektivního tlaku antivirových systémů (Botstein, 1980). Fágové geny jsou uspořádány do funkčních celků (tzv. genomových modulů), řídících lyzogenii, DNA replikaci, regulaci transkripce, sbalování, strukturu hlavy a bičíku, vlákna bičíku a lyzi. Určitý funkční modul jednoho fága může být nahrazen modulem z jiného fága, který má stejnou nebo podobnou funkci.

Sekvenace genomu několika kmenů *S. aureus* ukázala, že většina z nich obsahuje nejméně jednoho profága, ale některé kmeny (např. Newman) obsahují až čtyři profágy (Bae *et al.*, 2006). Profágy tedy působí jako významný zdroj genomové variability.

Obrázek 5: Schématické znázornění modulární struktury genomu fága ϕETA



Zelené šipky reprezentují otevřené čtecí rámce, jejich orientace pak směr transkripce. Šedými šipkami jsou označeny některé geny se známou funkcí. Pozice modulů znázorněna dle Kahánková *et al.* (2010).

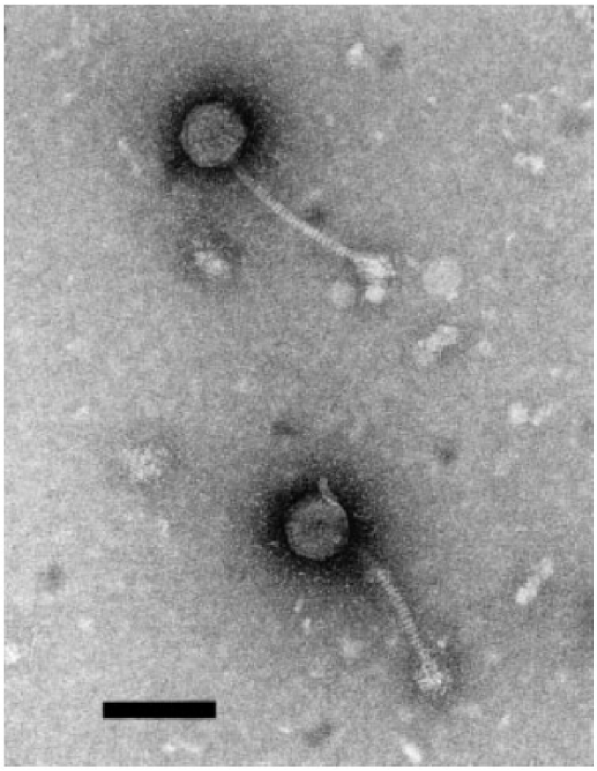
1.5.1. Genom *eta*-pozitivních bakteriofágů

Prvním *eta*-pozitivním fágem se sekvenovaným genomem byl fág ϕETA, indukovaný z klinického kmene *S. aureus* E-1, který byl izolován z pacienta s bulózním impetigem (Yamaguchi *et al.*, 2000). Fág ϕETA patří do čeledi *Siphoviridae* a serologické skupiny B. Je tvořen hexagonální hlavou a nekontraktilním flexibilním bičíkem s malým rozšířením na jeho konci (obr. 6; Yamaguchi *et al.*, 2000). Velikost genomu ϕETA je 43 081 bp a je tvořen terminálně redundantní a cyklicky permutovanou lineární dsDNA s obsahem G + C 35,4 %. Genom obsahuje 66 otevřených čtecích rámců (*orf1-orf66*), přičemž 38 z nich vykazuje homologii s již známými geny.

Gen *eta* je lokalizován v *orf66*. Mezi geny *eta* a *orf2* se nachází gen homologický s genem pro integrázu (*int*) ϕ11 (Ye *et al.*, 1990). V pozici 42 900 – 42 939 bp byl nalezen úsek s vysokým stupněm homologie k části připojovací sekvence *attP* fága ϕ11 (Yamaguchi *et al.*, 2000). Sekvence *attP* se nachází mezi geny *eta* a *int*. Blízkost umístění *eta* vedle *attP* pravděpodobně znamená, že gen pro ETA byl získán aberantním vystřižením profága z genomu bakterie. Rámec *orf61* je sekvenčně podobný genu pro hydrolázu buněčné stěny fága ϕ187 (Loessner *et al.*, 1999) a rámce *orf64* a *orf 65* jsou podobné genům kódujícím holin (*hol*) a amidázu (*ami*) fága ϕPVL (Kaneko *et al.*, 1998). Tyto tři rámce tvoří lytickou kazetu fága ϕETA (Yamaguchi *et al.*, 2000).

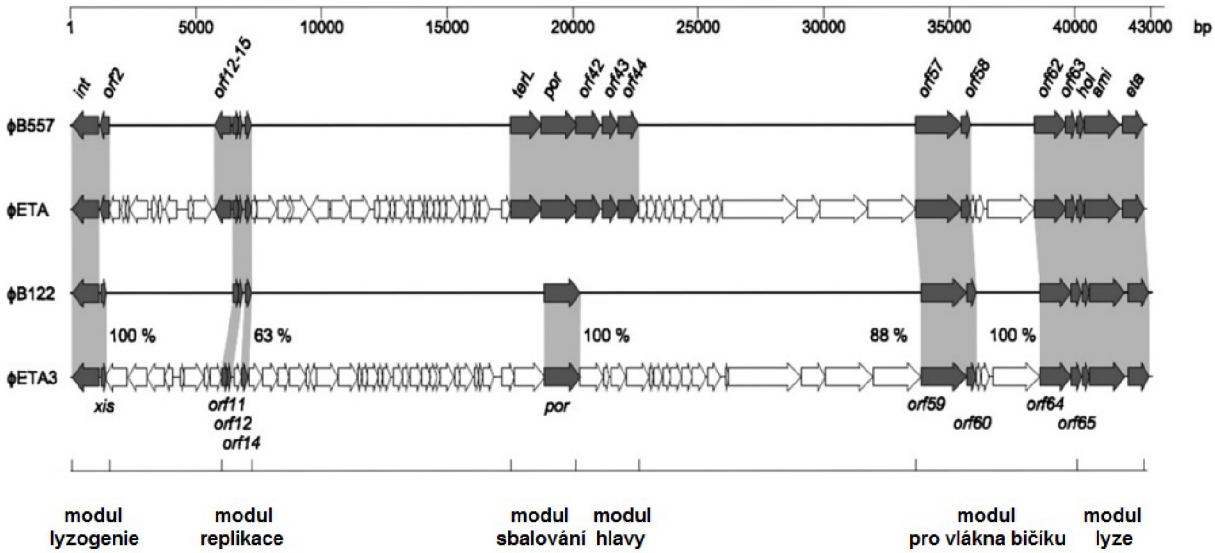
Jsou známy sekvence dalších dvou *eta*-pozitivních fágů: ϕETA2 a ϕETA3. Genom ϕETA2 má velikost 43 256 bp a zahrnuje 69 otevřených čtecích rámců. Genom ϕETA3 má velikost 43 282 bp a má 68 ORF (NCBI Genome, 2013). Podobnost fágů je: ϕETA a ϕETA2 (46%), ϕETA a ϕETA3 (63%), ϕETA2 a ϕETA3 (55%). Dále byl popsán *eta*-pozitivní fág ϕZM-1, který byl indukován z izolátu kmene *S. aureus* odebraného pacientovi s SSSS (Yoshizawa *et al.*, 2000). Genom tohoto fága nebyl sekvenován, nicméně byla prokázana jeho schopnost konvertovat kmeny *S. aureus* v producenty toxinu ETA. Holochová *et al.* (2010a) popsali další ETA-konvertující bakteriofágy ϕB122, ϕB531 a ϕB557, indukované z klinických kmenů *S. aureus* zodpovědných za šíření onemocnění *pemphigus neonatorum* v České republice. Porovnáním vybraných sekvencí bylo zjištěno, že ϕB531 a ϕB557 jsou totožné. Naopak ϕB122 se lišil v sekvenci 5 genů, přítomností genu *xis* a profilem virionových proteinů. Fág ϕB122 tak reprezentoval nový typ ETA-konvertujícího fága. Porovnání genomových oblastí těchto fágů znázorňuje obrázek 7 (Holochová *et al.*, 2010a).

Obrázek 6: Mikrofotografie virionů ϕETA pořízená elektronovým mikroskopem (Yamaguchi *et al.*, 2000)



úsečka odpovídá 100 nm

Obrázek 7: Srovnání vybraných sekvencí fágů ϕB122, ϕB557, ϕETA a ϕETA3 (Holochová *et al.*, 2010a)



Šipky reprezentují otevřené čtecí rámce, jejich orientace pak směr transkripce. Sekvenované otevřené čtecí rámce/geny šesti modulů jsou vyznačeny tmavě šedými šipkami. ORF/geny vykazující shodu či podobnost v sekvenci jsou spojeny světle šedou barvou.

1.5.2. Mechanismus vzniku nových ET-pozitivních kmenů

Příčinou vzniku nových ET-pozitivních kmenů *S. aureus* je horizontální přenos genů. Vzhledem k typům MGE, které nesou geny pro exfoliativní toxiny, se uplatňuje především fágová konverze a transdukce. Nejlépe popsán je přenos genu *eta* pomocí lyzogenní fágové konverze. Přesný mechanismus horizontálního přenosu *etb* a *etd* nebyl dosud popsán. Gen kódující toxin ETA je součástí genomu mírného (temperovaného) bakteriofága ϕETA, který se může začlenit do chromozomu *S. aureus* a přetrvávat v něm ve formě profága (Yamaguchi *et al.*, 2000). K fágové konverzi dochází tak, že po indukci lytického cyklu (např. mitomycinem C, UV zářením), se replikované fágové částice ϕETA mohou přenést do ET-negativních kmenů. Z nich se po integraci lyzogenu stanou ET-pozitivní kmeny.

Začlenění genomu fága do genomu bakterie je umožněno místně specifickou rekombinací mezi krátkými obrácenými repeticemi obou genomů pomocí fágové integrázy (Carroll *et al.*, 1995). V genomu profága se na jeho koncích nacházejí místa *attL* a *attR*, které odpovídají připojovací sekvenci fága *attP*. V genomu bakterie se pak nachází homologní připojovací sekvence *attB*. Místem začlenění fága jsou obvykle geny pro tRNA, které jsou následně inzerčně inaktivovány (Campbell, 1992). Fágy proto často nesou vlastní geny pro tRNA odlišné od těch bakteriálních (Ventura *et al.*, 2003). Při lyzogenní fágové konverzi dochází ke změně fenotypu bakterie. Pozitivní konverze přináší zisk nového znaku, např. produkce toxinu ETA (Yamaguchi *et al.*, 2000). Inzerční inaktivací genu dochází k tzv. negativní lyzogenní konverzi. Příkladem je inaktivace genu pro β-lyzin (*hlb*) u *S. aureus* genomem fága ϕ13 (Coleman *et al.*, 1991).

Zásadní vliv bakteriofágů na evoluci ETA-pozitivních kmenů *S. aureus* vyplývá ze studie provedené na kmenech zodpovědných za propuknutí *pemphigus neonatorum* ve dvou českých nemocnicích (Růžičková *et al.*, 2003). Kmeny byly testovány na přítomnost profágů skupin A, B a F. Bylo zjištěno, že všechny ETA-pozitivní kmeny obsahovaly profágy skupiny B nesoucí gen *eta*. ETA-pozitivní kmeny mohou obsahovat různé ETA profágy spadající do ETA-B skupin B1 až B6 (Holochová *et al.*, 2010b).

Temperované fágy hrají důležitou roli i v procesu transdukce. Do vznikající fágové kapsidy mohou být, díky chybné excizi profága, vneseny i části bakteriálního genomu, např. ostrov patogenity nebo plazmid (Novick a Subedi, 2007). Horizontální přenos genů je významným evolučním nástrojem, umožňujícím zisk nových vlastností, které mohou znamenat selekční výhodu pro svého nositele (zisk genů pro rezistenci k antibiotikům, geny

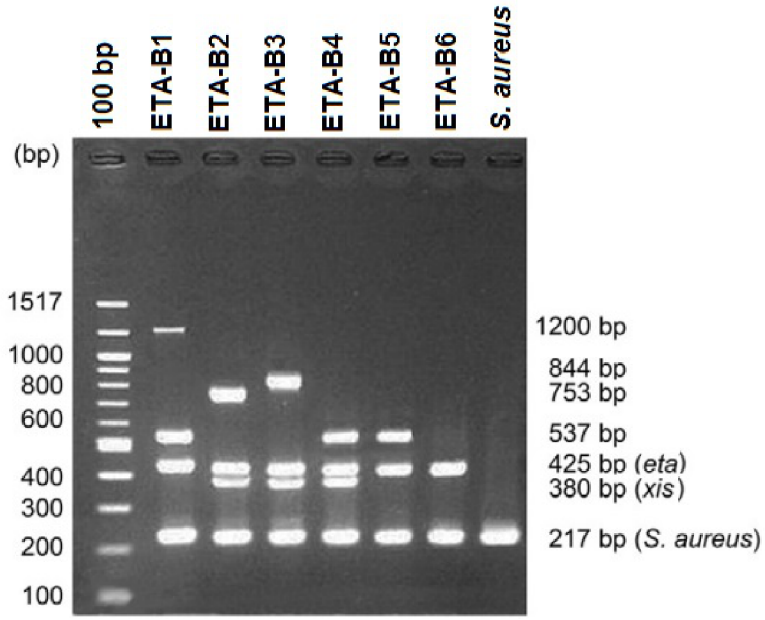
metabolických drah, geny pro toxiny a jiné virulenční faktory apod.). Bakteriofágy významně ovlivňují horizontální genomiku, evoluci, virulenci a genotypovou variabilitu bakterií.

1.6. Metody detekce a klasifikace *eta*-pozitivních fágů a kmenů *S. aureus*

Toxinogenní kmeny lze odhalit přímým stanovením konkrétních toxinů (např. gelovou imunoprecipitací, latexovou aglutinací, radioimunologicky), ale i detekcí specifických genových sekvencí pomocí PCR.

Růžičková *et al*. (2005) navrhli multiplex PCR pro rychlou detekci genů jednotlivých serotypů exfoliativního toxinu (*eta*, *etb* a *etd*). Později byla navržena multiplex PCR pro detekci šesti typů profágů skupiny B: ETA-B1, ETA-B2, ETA-B3, ETA-B4, ETA-B5 a ETA-B6 (obr. 8; Holochová *et al*., 2010b). Pro návrh specifických primerů bylo využito známých sekvencí fágů ϕETA, ϕETA2 a ϕETA3. Detekce na základě fágového polymorfizmu usnadňuje diagnózu klinických kmenů způsobujících epidermolytická onemocnění. Umožňuje také rychlou identifikaci dosud neznámých ETA-konvertujících B profágů, čehož lze využít pro rozlišení i blízce příbuzných ETA-pozitivních kmenů.

Obrázek 8: Elektroforetogram multiplex PCR pro detekci profágových ETA-B skupin (Holochová *et al*., 2010b)



Za pomoci srovnávací analýzy a na základě modulární struktury fágů byla navržena PCR pro více lokusů ke klasifikaci bakteriofágů čeledi *Siphoviridae* (Kahánková *et al.,* 2010). Typizace fágů je založena na kombinaci různých variant genomových modulů. Genomové moduly byly klasifikovány na základě genů pro integrázu (10 typů), antirepresor (5 typů), proteiny replikace polA, dnaC a dnaD (4 typy), dUTPázu (4 typy), portálový protein (8 typů), vlákna bičíku (4 typy) a endolyzin (4 typy).

Pro epidemiologické účely se provádí typizace kmenů *S. aureus.* Růžičková *et al.* (2012) provedli genotypovou charakterizaci 127 ET-pozitivních kmenů *S. aureus* získaných z 23 českých a jedné slovenské nemocnice v letech 1998 – 2011. Identifikovali 21 genotypů, patřících do čtyř klonálních komplexů (CC). Vedle PFGE, PCR detekce *eta*, *etb* a ETA-B skupin byly ve studii využity i další metody: *spa* PCR typizace, založená na detekci polymorfizmu oblasti X nesené genem *spa* (Shopsin *et al.*, 1999), MLST využívající porovnání sekvencí genů *arcC*, *aroE*, *glpF*, *gmk*, *pta*, *tpi* a *yqiL* (Enright *et al.*, 2000) a PCR detekce serologických skupin profágů A, B, Fa a Fb (Pantůček *et al.*, 2004).

Z výše uvedeného vyplývá, že exfoliatin produkující kmeny *Staphylococcus aureus* představují zdravotní problém zejména v nemocničním prostředí. Jsou buď monolyzogenní (obsahují jednoho profága) až polylyzogenní (obsahují až tři profágy). U monolyzogenních kmenů byly dosud identifikovány výhradně profágy seroskupiny B. Je tedy možné předpokládat, že profágy této serologické skupiny hrají v epidemiologii ET-pozitivních kmenů *S. aureus* dominantní roli. Z tohoto hlediska byl cíl této diplomové práce zaměřen na studium molekulárně genetických vlastností *eta*-pozitivních fágů, které dosud nebyly izolovány a charakterizovány.

2. CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE

Cílem diplomové práce bylo provedení komparativní genomické analýzy dvou typů dosud nepopsaných ETA-konvertujících bakteriofágů, které byly izolovány z klinických kmenů *S. aureus*. Dosažené výsledky molekulární charakteristiky bakteriofágů byly využity ke zhodnocení jejich role v horizontální genomice, molekulární epidemiologii a evoluci kmenů *S. aureus*, zodpovědných za hromadná epidermolytická onemocnění v porodnicích a nemocnicích v České republice i zahraničí.

Splnění cílů diplomové práce bylo podmíněno provedením následujících dílčích úkolů:

1. Izolace *eta*-pozitivních fágů typu ETA-B2 a ETA-B5 z vybraných klinických kmenů *S. aureus* s definovaným genotypem indukcí UV zářením

2. Izolace fágové DNA

3. Restrikční štěpení izolované fágové DNA a určení míry heterogenity izolovaných ETA-fágů analýzou jejich DNA

4. Analýza vybraných sekvencí genů nebo DNA segmentů, zvolených na základě jejich funkce a lokalizace ve fágových modulech

5. Porovnání analyzovaných sekvencí s analogickými sekvencemi v genomech *eta*-pozitivních fágů dostupných v databázi GenBank a jiných odborných článcích

6. Potvrzení přenosu genu *eta* a fágové konverze produkce toxinu ETA metodou makrorestrikční analýzy pulzní gelovou elektroforézou a RPLA

7. Zhodnocení role ETA-fágů v horizontální genomice a vlivu profágů seroskupiny B na virulenci a evoluci toxinogenních kmenů *S. aureus*

3. MATERIÁL A METODY

3.1. Bakteriální kmeny a bakteriofágy

Pro komparativní genomovou analýzu byly vybrány *eta*-pozitivní bakteriofágy ϕ236 a ϕ841, izolované z klinických kmenů *S. aureus* 08/236 a 06/841. Základní charakteristika fágů byla provedena na pracovišti LMDM. Charakterizaci kmenů provedli Růžičková *et al.* (2012). Souhrnně jsou vlastnosti studovaných kmenů a fágů uvedeny v tabulce 1.

Tabulka 1: Charakteristika studovaných bakteriofágů a donorových klinických kmenů

Kmen	**08/236**	**06/841**
Původ	Náchod	Trnava
Rok izolace	2008	2006
Zdroj	puchýř dítěte	puchýř dítěte
Klonální komplex (CC)	CC121	CC88
Genotyp	G-4	G-21
MLST	ST121	ST88
PFGE typ	D	O
spa typ	t159	t186
Lyzotyp	L6 (BFb)	L6 (BFb)
ETA-B typ	B5	B2
Bakteriofág	**ϕ236**	**ϕ841**
Čeleď	*Siphoviridae*	*Siphoviridae*
Druh	ϕ11-like	ϕ11-like
Serologická skupina	B	B
Podskupina	Bc	Ba
ETA-B typ	B5	B2
Integrázový typ	Sa1int	Sa1int

Charakteristika kmenů *S. aureus* dle Růžičková *et al.* (2012), charakteristika bakteriofágů provedena na pracovišti LMDM

Kmeny *S. aureus* a fágy sloužící jako pozitivní a negativní kontroly dílčích experimentů jsou uvedeny v tabulce 2, kmeny a fágy srovnávané s fágy ϕ236 a ϕ841 jsou uvedeny v tabulce 3.

Tabulka 2: Kmeny *S. aureus* a fágy použité jako pozitivní a negativní kontroly

Kmen *S. aureus*	Charakteristika	Použití	Zdroj
1039 (CCM7725)	bezprofágový kmen bez R-M systému	negativní kontrola PCR	Yoshizawa, 1985
1039 (ϕ166+)	lyzogenní kmen	pozitivní kontrola PCR, ETA-B typ B6b	sbírka LMDM, Brno
(NCTC 8325)	vícenásobný lyzogen	pozitivní kontrola PCR detekce seroskupin, velikostní standard PFGE	sbírka LMDM, Brno
98/557 (CCM7719)	obsahuje profága typu ETA-B1 podskupiny Ba	pozitivní kontrola PCR, ETA-B typ B1, podskupina Ba	sbírka CCM, Brno
02/018 (CCM7721)	obsahuje profága typu ETA-B3i	pozitivní kontrola PCR, ETA-B typ B3i	sbírka CCM, Brno
03/596 (CCM7724)	obsahuje profága typu ETA-B6a	pozitivní kontrola PCR, ETA-B typ B6a	sbírka CCM, Brno
04/058 (CCM7723)	obsahuje profága typu ETA-B5	pozitivní kontrola PCR, ETA-B typ B5	sbírka CCM, Brno
07/122 (CCM7722)	obsahuje profága typu ETA-B4	pozitivní kontrola PCR, ETA-B typ B5	sbírka CCM, Brno
07/126	obsahuje profága typu ETA-B2b	pozitivní kontrola PCR, ETA-B typ B2b	sbírka CCM, Brno
07/423 (CCM7720)	obsahuje profága typu ETA-B2a	pozitivní kontrola PCR, ETA-B typ B2a	sbírka CCM, Brno
Bakteriofág	**Charakteristika**	**Použití**	**Zdroj**
ϕ532	bakteriofág, serologická podskupina Bc	pozitivní kontrola PCR genotypizace a serologické podskupiny Bc	sbírka LMDM, Brno
ϕ122 (CCM7924)	bakteriofág, serologická podskupina Bb	pozitivní kontrola PCR genotypizace a serologické podskupiny Bb	sbírka CCM, Brno
ϕ166	bakteriofág	pozitivní kontrola PCR genotypizace	sbírka LMDM, Brno
ϕX2 (NCTC 9858)	bakteriofág, serologická podskupina Be	pozitivní kontrola PCR serologické podskupiny Be	National collection of type cultures, UK
ϕ71 (CCM 7916)	Bakteriofág, serologická podskupina Bd	pozitivní kontrola PCR serologické podskupiny Bd	sbírka CCM, Brno

Tabulka 3: Kmeny *S. aureus* a fágy použité pro srovnání se studovanými fágy

Kmen *S. aureus*	Místo izolace	Charakteristika	Zdroj
98/557	Ivančice	ETA-B typ B1	sbírka CCM, Brno
02/018	Pelhřimov	ETA-B typ B3i	sbírka LMDM, Brno
03/589	Trnava	ETA-B typ B2	sbírka LMDM, Brno
03/592	Trnava	ETA-B typ B2	sbírka LMDM, Brno
03/596	Brno	ETA-B typ B6a	sbírka LMDM, Brno
03/599	Brno	ETA-B typ B6a	sbírka LMDM, Brno
04/058	Prachatice	ETA-B typ B5	sbírka LMDM, Brno
06/833	Trnava	ETA-B typ B2	sbírka LMDM, Brno
07/122	Strakonice	ETA-B typ B4	sbírka LMDM, Brno
07/423	Stod	ETA-B typ B2	sbírka LMDM, Brno
10/109	Česká Lípa	ETA-B typ B6b	sbírka LMDM, Brno
10/171	Pelhřimov	ETA-B typ B2	sbírka LMDM, Brno
10/310	Pelhřimov	ETA-B typ B2	sbírka LMDM, Brno
Bakteriofág	**Použití**		**Zdroj**
ϕ122	srovnání *Hin*dIII restrikčních spekter, PCR detekce sekvence ETA2-18		sbírka LMDM, Brno
ϕ166			sbírka LMDM, Brno
ϕ532			sbírka LMDM, Brno
ϕ234	PCR detekce sekvence ETA2-18		sbírka LMDM, Brno
ϕ575			sbírka LMDM, Brno

3.2. Materiál

3.2.1. Kultivační a uchovávací média

Masopeptonový bujón (MPB)

Nutrient broth (Oxoid, UK)	13 g
Pepton (HiMedia Lab., Indie)	5 g
Yeast extract (Oxoid, UK)	3 g
Destilovaná H_2O	1000 ml

pH upraveno 10 M NaOH na hodnotu 7,2

Luria - Bertani bujón (LB)

Trypton (HiMedia Lab., Indie)	10 g
NaCl (Lach-Ner s.r.o., ČR)	10 g
Yeast extract (Oxoid, UK)	5 g
Destilovaná H_2O	1000 ml

pH upraveno 10 M NaOH na hodnotu 7,0

Masopeptonový agar 1,5 % (MPA)

Agar (Oxoid, UK)	15 g
Nutrient broth (Oxoid, UK)	13 g
Pepton (HiMedia Lab., Indie)	5 g
Yeast extract (Oxoid, UK)	3 g
Destilovaná H_2O	1000 ml

pH upraveno 10 M NaOH na hodnotu 7,2

Masopeptonový agar 0,7 % (MPA)

Agar no.l (Oxoid, UK)	7 g
Nutrient broth (Oxoid, UK)	13 g
Pepton (HiMedia Lab., Indie)	5 g
Yeast extract (Oxoid, UK)	3 g
Destilovaná H_2O	1000 ml

pH upraveno 10 M NaOH na hodnotu 7,2

Luria - Bertani agar (LBA)

Agar technical no.3 (Oxoid, UK)	15 g
Trypton (HiMedia Lab., Indie)	10 g
NaCl (Lach-Ner s.r.o., ČR)	10 g
Yeast extract (Oxoid, UK)	5 g
Destilovaná H_2O	1000 ml

pH upraveno 10 M NaOH na hodnotu 7,0

Hogness modified freezing médium (HMFM)

3,6 mM K_2HP0_4	0,164 g
1,3 mM K_2HP0_4	0,035 g
2,0 mM Na-citrát	0,118 g
1,0 mM $MgSO_4.7H_2O$	0,049 g
4,4 % (v/v) glycerol	8,8 ml
doplněno H_20 do celkového objemu	200 ml

2 × YT médium

Trypton (HiMedia Lab., Indie)	16 g
NaCl (Lach-Ner s.r.o., ČR)	5 g
Yeast extract (Oxoid, UK)	10 g
Destilovaná H_2O	1000 ml

pH upraveno 10 M NaOH na hodnotu 7,0

10 × profágový bujón

Nutrient broth (Oxoid, UK)	13 g
NaCl (Lach-Ner s.r.o., ČR)	2 g
Yeast extract (Oxoid, UK)	2 g
Trypton (HiMedia Lab., Indie)	10 g
Destilovaná H_2O	100 ml

3.2.2. Enzymy

3.2.2.1. Restrikční štěpení

Restrikční endonukleázy:

*Hin*dIII, (Roche Diagnostics, SRN)	zásobní koncentrace: 10 U/µl
*Sma*I, (Roche Diagnostics, SRN)	zásobní koncentrace: 10 U/µl

Pufry:

pufr A, (Roche Diagnostics, SRN)	10× koncentrovaný
pufr B, (Roche Diagnostics, SRN)	10× koncentrovaný

3.2.2.2. Klonování

T4-DNA ligáza (BioLabs Inc., UK)	zásobní koncentrace 400 U/µl
Quick ligační pufr (BioLabs Inc., UK)	2× koncentrovaný
Alkalická fosfatáza (Roche Diagnostics, SRN)	zásobní koncentrace 10 U/µl
Defosforylační pufr (Roche Diagnostics, SRN)	10× koncentrovaný

3.2.2.3. Další používané enzymy

Proteináza K (Roche Diagnostics, SRN)	zásobní koncentrace 20 mg/ml
Pronáza E (SIGMA, SRN)	zásobní koncentrace 20 mg/ml
Deoxyribonukleáza (SIGMA, SRN)	zásobní koncentrace 1 mg/ml
Ribonukleáza (SIGMA, SRN)	zásobní koncentrace 10 mg/ml
Lyzostafin (SIGMA, SRN)	zásobní koncentrace 10 mg/ml

3.2.3. Materiál pro selekci transformovaných buněk *E. coli*

Ampicilin (SIGMA, SRN)	zásobní koncentrace 100 mg/ml
IPTG (QIAGEN, SRN)	zásobní koncentrace 0,1 M
X-gal (Duchefa Biochemie, Nizozemsko)	zásobní koncentrace 20 mg/ml

3.2.4. Materiál pro PCR

Taq DNA polymeráza (BioLabs Inc., UK)	zásobní koncentrace 5 U/µl
ThermoPol pufr (BioLabs Inc., UK)	10× koncentrovaný
Perfect*Taq* DNA polymeráza (5 PRIME, USA)	zásobní koncentrace 5 U/µl
Taq pufr pro PCR (5 PRIME, USA)	10× koncentrovaný
Roztok $MgCl_2$ (5 PRIME, USA)	zásobní koncentrace 25 mM
FastStart PCR Master (Roche Diagnostics, SRN)	2× koncentrovaný
dATP, dTTP, dGTP, dCTP (Roche Diagnostics, SRN)	zásobní koncentrace 100 mM

3.2.5. Elektroforéza

Agaróza (SERVA Electrophoresis, SRN)
Agaróza SeaKem GTG (Lonza, USA)

Velikostní standardy:

100 bp DNA ladder (BioLabs Inc., UK)	fragmenty 100 bp – 1 517 bp
2-log DNA ladder (BioLabs Inc., UK)	fragmenty 100 bp – 10 000 bp

3.2.6. Chemikálie

$CaCl_2$ (Penta, ČR)	Izoamylalkohol (Lachema, ČR)
$CH_3COONa.3H_2O$ (Lachema, ČR)	KCl (Lachema, ČR)
EDTA (SIGMA, SRN)	K_2HPO_4 (Lachema, ČR)
Ethidium Bromid (SIGMA, SRN)	Kyselina octová (Penta, ČR)
Ethylalkohol (Penta, ČR)	$Na_2HPO_4.2H_2O$ (Lachema, ČR)
Fenol (Penta, ČR)	NaCl (Lach-Ner s.r.o., ČR)
Glycerol (SIGMA, SRN)	Sodiumdodecylsulfát (SIGMA, SRN)
Chloroform (Pentra, ČR)	Tris-base (SIGMA, SRN)
Izopropylalkohol (Lachema, ČR)	Triton X-100 (SIGMA, SRN)

3.3. Laboratorní přístroje a pomůcky

Centrifugy:
BR4i (Thermo Electron Corporation)
Mikro 220R (Hettich Zentrifugen)
Mini Spin plus (Eppendorf)
ultracentrifuga Beckman Coulter (Beckman)

Spektrofotometry:
Nanodrop ND-2000c (Thermo Scientific)
Cell Density Meter CO8000 (WPA – biowave)

Stolní parní sterilizátory:
OT 020 V a OT 032
(KRD Molecular Technologies)

Proudové zdroje pro elektroforézu:
EC 105 (Thermo Electron Corporation)
Power PAC (BioRad)
2197 (LKB Bromma)

Termostaty:
Stolní termostat DB-2D (Techne)
Termostat SHEL LAB (Biotech)
Termostat BT120 (Laboratorní přístroje Praha)

Box na PCR Biosan (Biotech)
Digitální kamerový systém EDAS290 (Kodac)
Laminární box Steril Antares (Schoeller Instruments)
pH metr pH210 (HANNA Instruments)

Stolní vodní lázeň (MLW)
Termocykler T-gradient (Biometra)
T Personal Thermocykler (Biometra)
Thermo Shaker TS-100 Biosan (Biotech)
Třepačka Lab Dancer (IKA)
Vortex-2 Genie (Scientific Industries)
Váhy Navigator (OHAUS)
Vakuová odparka Savant SPD121P (Thermo Electron Corporation)
Zařízení pro PFGE - CHEFF MAPPER (BioRad)

3.4. Počítačový software a internetové nástroje pro analýzu sekvencí

- ANAGEL 1.2 (Mrázek a Španová, 1992) - odhad velikosti restrikčních fragmentů
- BLAST (National Center for Biotechnology Information, USA) - analýza sekvencí
- Easyfig 2.1 (Sullivan *et al.*, 2011) - tvorba genomových modelů a jejich srovnání
- *In silico* simulation of molecular biology experiments (Bikandi *et al.* 2013; http://insilico.ehu.es) - *in silico* PCR
- NCBI Genome Workbench 2.6.5 (National Center for Biotechnology Information, USA) - analýza a grafické znázornění sekvencí
- NEBcutter V2.0 (Vincze *et al.*, 2003) - *in sillico* restrikční štěpení
- ORF Finder (National Center for Biotechnology Information, USA) - detekce otevřených čtecích rámců
- PHAST (Zhou *et al.*, 2011; http://phast.wishartlab.com) - *in silico* hledání profágů
- PSIPRED (Buchan *et al.*, 2010; http://bioinf.cs.ucl.ac.uk) - predikce sekundární struktury proteinů
- Primer-BLAST (National Center for Biotechnology Information, USA) - návrh PCR primerů
- VecScreen (National Center for Biotechnology Information, USA) - detekce vektorových sekvencí

3.5. Metody

3.5.1. Izolace bakteriofága

3.5.1.1. Indukce excize profága

Indukce excize profága byla provedena na kmenech *S. aureus* 06/841 a 08/236 pomocí UV záření.

1. Zaočkovat kulturu donorového kmene do 10 ml 2× YT média, inkubace 18 hod./37 °C.
2. Kulturu přelít do 50 ml sterilního MPB ve 200ml Erlenmeyerově baňce, intenzivním třepáním provzdušňovat 2 hod. při 37 °C.
3. 45 ml narostlé kultury přenést do kónické zkumavky o objemu 50 ml, centrifugace 20 min./3000 rpm.
4. Sediment resuspendovat v 5 ml 0,85% fyziologického roztoku a naředit na OD_{600} = 0,15 – 0,20.
5. 10 ml naředěné suspenze přenést do sterilní skleněné Petriho misky (pro každý režim jedna), umístit do indukční skříně a odkrýt víčko.
6. Indukce UV zářením při vzdálenosti 50 cm od UV lampy (15 W) při době expozice 30 s, 35 s a 40 s.
7. Ozářenou misku přemístit do temného boxu.
8. Ozářenou suspenzi přenést skleněnou pipetou do provzdušňovačky s 10 ml 10× koncentrovaného profágového bujónu a 30 ml 0,85% fyziologického roztoku.
9. Inkubace 2 hod./37 °C za mírného provzdušňování, poté kontrolní stanovení titru kapkovou metodou a nechat do druhého dne v lednici.
10. Lyzát přenést do 50ml kónické zkumavky, centrifugace 10 min./5000 rpm.
11. Lyzát přenést do nové 50ml kónické zkumavky přefiltrováním přes filtr o velikosti pórů 0,45 μm.

3.5.1.2. Stanovení titru kapkovou metodou

1. Naočkovat 0,1 ml kmene 1039 do 20 ml MPB. Kultivace 18 hod./37 °C.
2. Rozvařit 0,7% MPA (2,5 ml ve zkumavce) a vytemperovat na 45 °C.
3. Do kultury přidat 1/10 objemu 0,02 M $CaCl_2$ a přenést 0,1 ml této suspenze do zkumavky s 0,7% MPA. Obsah zkumavky vylít na Petriho misku s 1,5% MPA.
4. Po zatuhnutí nanést na misku 10 µl lyzátu ředěného v MPB v rozmezí 10^{-1} až 10^{-7}.
5. Inkubace 18 hod./37 °C, misky otočené dnem vzhůru, stanovení titru (PFU/ml)

3.5.1.3. Izolace fága z jedné plaky

Kmeny 06/841 a 08/236 obsahují ve svém genomu profágy serologické skupiny B a Fb. Při fágové excizi se uvolňují oba typy a v lyzátu je tak jejich směs. Pro izolaci DNA pouze jednoho fága je nutné pomnožit fágy pouze z jedné plaky.

1. Připravit kulturu pomnožovacího kmene 1039 ve 20 ml MPB, kultivace 18 hod./37 °C.
2. Vyočkovat lyzát indukovaného fága přes 0,7% MPA na pomnožovací kmen. Lyzát naředit tak, aby po kultivaci (18 hod./37 °C) byly na Petriho miskách jednotlivé plaky.
3. Z kultury 1039, která byla kultivována 18 hod./37 °C ve 20 ml MPB, připravit suspenzi buněk s OD_{600} = 0,2 v MPB.
4. Z Petriho misek náhodným výběrem odpíchnout 20 plak. Každou plaku jednotlivě přenést do Eppendorfovy zkumavky s 500 µl naředěné suspenze kmene 1039 a 1/10 objemu 0,02 M $CaCl_2$.
5. V termoboxu třepat 2 hod./37 °C. Centrifugace 15 min./13 000 rpm. 10 vzorků uschovat do lednice pro případné další zpracování.
6. Zbylých deset vzorků vyočkovat na misku s 1,5% MPA přes 0,7% MPA (k 2,5 ml 0,7% MPA přidat 250 µl 0,02 M $CaCl_2$, 100 µl lyzátu a 100 µl kultury 1039).
7. Kultivace 18 hod./37 °C. Poté smýt viriony 3 ml MPB/10 min. působení. Centrifugace 15 min./13 000 rpm.
8. Ověřit typ fága izolací DNA kitem QIAEX II (QIAGEN, SRN) dle pokynů výrobce a pomocí multiplex PCR na serologické skupiny (B, Fa, Fb)

9. Po identifikaci fága připravit velké množství fágového lyzátu s titrem min. 10^8 PFU/ml pro izolaci DNA fenol-chloroformem.

3.5.1.4. Příprava fágového lyzátu

1. Naočkovat kulturu kmene 1039 do 20 ml MPB. Kultivace 18 hod./37 °C.
2. Do 20 ml MPB ve sterilní provzdušňovací lahvi přenést 0,8 ml bakteriální kultury a provzdušňovat 4 – 5 hod./37 °C, do zákalu odpovídajícímu 10^9 CPM/ml.
3. Přidat 1/10 objemu 0,02 M $CaCl_2$ a 2 – 3 ml fágového lyzátu.
4. Provzdušňovat při 37 °C do úplné lyze bakteriální kultury, maximálně však 3 hod. Poté uložit do lednice (4 °C) do příštího dne.
5. Purifikace lyzátu centrifugací 15 min./4500 rpm a přefiltrováním přes filtr o velikosti pórů 0,45 μm.
6. Ze získaného lyzátu připravit stejným postupem fágový lyzát (s titrem 10^{10} – 10^{11} PFU/ml) o objemu 300 ml pro izolaci fágové DNA (poměr inokula: 2 ml kultury 1039 do 50 ml MPB)

   Pozn.: takto bylo připraveno 600 ml fágového lyzátu každého z fágů ϕ841 a ϕ236.

3.5.1.5. Izolace fágové DNA fenol-chloroformovou metodou

1. Lyzát (300 ml) rozplnit do 6 centrifugačních zkumavek, centrifugace 2,5 hod./22 000 rpm na ultracentrifuze.
2. Odlít supernatant, k sedimentu přidat 750 μl fágového pufru (10mM NaCl, 50 mM Tris.HCl s pH 8, 10mM $CaCl_2$). Nechat rozpustit do dalšího dne v lednici.
3. Rozpuštěné suspenze slít do 15ml kónické zkumavky, přidat 6 μl DNázy (zásobní roztok 1 mg/ml) a 30 μl RNázy (zásobní roztok 10 mg/ml). Inkubace 30 min./37 °C.
4. Centrifugace 3 ks zkumavek s gelem 5 min./3500 rpm.
5. Do jedné zkumavky s gelem přelít fágovou suspenzi a Sevageovu směs (24 dílů chloroformu : 1 díl izoamylalkoholu) v poměru objemu 1 : 1. Promíchat převrácením a centrifugovat 10 min./3500 rpm.
6. Odebrat horní vodnou fázi do 15ml zkumavky, přidat 240 μl EDTA, 150 μl pronázy E (zásobní koncentrace 20 mg/ml) a 300 μl 10% SDS. Promíchat a inkubovat 1 hod./37 °C.

7. Přelít do další zkumavky s gelem, přidat roztok fenol-chloroform v poměru 1 : 1, promíchat převrácením a centrifugace 10 min./3500 rpm.
8. Horní vodnou fázi přelít do 15ml zkumavky s gelem, přidat Sevageovu směs v poměru 1 : 1, promíchat převrácením a centrifugace 10 min./3500 rpm.
9. Horní vodnou fázi obsahující fágovou DNA přelít do kónické zkumavky o objemu 50 ml, přidat 1/10 objemu 3M octanu sodného (pH 5,2) a 2 objemy ledového 96% etanolu. Dojde ke srážení DNA.
10. Centrifugace 2 min./2000 rpm při 4 °C. Rychle odlít etanol do sterilní kádinky.
11. K DNA přidat 1 ml 70% etanolu (pelet musí být ponořený) a nechat stát 10 min., centrifugovat 5 min./3000 rpm při 4 °C. Rychle odlít etanol a nechat odpařit při pokojové teplotě nebo na vakuové odparce.
12. DNA rozpustit v 500 µl TE pufru o pH = 7,5 (10 ml 1 M Tris-base, pH = 8; 2 ml 0,5 M EDTA, doplnit deionizovanou vodou do objemu 1 000 ml, upravit pH pomocí HCl). Uchovávat v lednici a po 3 dnech změřit koncentraci a čistotu DNA. V případě potřeby doředit na koncentraci 1500 µg/ml TE pufrem.

3.5.2. Restrikční analýza bakteriofágové DNA

DNA bakteriofágů ϕ236 a ϕ841 byla štěpena restrikční endonukleázou *Hin*dIII v pufru B při 37 °C.

1. Do 1,5 ml Eppendorfovy zkumavky byla namíchána restrikční směs:
   15,5 µl deionizované H_2O
   2 µl pufru B
   2 µl izolované bakteriofágové DNA (1- 2 µg)
   5 U restriktázy *Hin*dIII (0,5 µl)
2. Směs inkubovat 4 hod./37 °C.
3. Do restrikční směsi přidat další 4 U restriktázy *Hin*dIII (0,4 µl).
4. Inkubovat přes noc při 37 °C.
5. Výsledek restrikčního štěpení ověřit na 1,5 % elektroforetickém agarózovém gelu v 1× TAE (20 ml 50× TAE, 980 ml destilované H_2O) při napětí 5 V/cm.

3.5.3. Elektroforéza v agarózovém gelu

Elektroforéza v agarózovém gelu probíhala v 1× koncentrovaném TAE pufru připraveném ředěním z 50× koncentrovaného zásobního roztoku (24,2 g Tris-base; 57,1 ml ledové kyseliny octové; 100 ml 0,5 M EDTA; pH = 8; doplnit destilovanou vodou do celkového objemu 1000 ml). Pro separaci PCR amplikonů, fragmentů restrikčního štěpení a štěpeného vektoru byl použit 1,2% – 2,5% agorózový gel. Po elektroforéze byl gel obarven v roztoku ethidium bromidu o koncentraci 1 μg/ml po dobu 30 min., opláchnut destilovanou H_2O a fotografován pod UV světlem o vlnové délce 302 nm.

3.5.4. PCR

PCR byla použita k detekci vybraných genů a sekvencí v genomu studovaných fágů. Multiplex PCR umožnila přesnější identifikaci a srovnání s ostatními genomy *eta*-fágů.

3.5.4.1. Detekce fágových seroskupin

Pomocí multiplex PCR (Pantůček *et al.*, 2004) byla detekována seroskupina fágů ϕ236 a ϕ841. S ohledem na lyzotyp donorových kmenů byly k detekci vybrány geny pro portálový protein Fa a Fb fágů a gen pro vlákna bičíku specifický pro B fágy. Podmínky PCR a elektroforézy jsou uvedeny v tabulce 4, složení PCR směsi v tabulce 5 a přehled použitých primerů v tabulce 6.

Tabulka 4: Podmínky multiplex PCR a elektroforézy

	Teplota (°C)	Čas
Počáteční denaturace	94	5´
Denaturace	94	1´
Připojení primerů	58	1´ 30´´
Prodlužování primerů	70	1´ 30´´
Závěrečné prodlužování primerů	70	5´
Počet cyklů	30	
Elektroforéza	1,5% gel, 5 V/cm	

Tabulka 5: Složení směsi pro multiplex PCR

Reagencie	Zásobní koncentrace	Výsledná koncentrace	Objem v jedné reakční směsi (µl)
deionizovaná H_2O	-	-	6,3
ThermoPol pufr	10×	1×	2,5
dNTP	2 mM	0,2 mM	2,5
Primer SGB1	10 µM	0,5 µM	1,2
Primer SGB2	10 µM	0,5 µM	1,2
Primer SGFa1	10 µM	0,8 µM	2
Primer SGFa2	10 µM	0,8 µM	2
Primer SGFb1	10 µM	0,4 µM	1
Primer SGFb2	10 µM	0,4 µM	1
Primer SAU1	10 µM	0,4 µM	1
Primer SAU2	10 µM	0,4 µM	1
Taq DNA polymeráza	5 U/ µl	1,5 U	0,3
Templátová DNA	50× ředěná	50 – 100 ng	3

Tabulka 6: Přehled použitých primerů

Serologická skupina	Název primeru	Nukleotidová sekvence (5´→ 3´)	Amplikon (bp)	Citace
B	SGB1	ACTTATCCAGGTGGYGTTATTG	405	Pantůček *et al.*, 2004
	SGB2	TGTATTTAATTTCGCCGTTAGTG		
Fa	SGFa1	TACGGGAAAATATTCGGAAG	548	Pantůček *et al.*, 2004
	SGFa2	ATAATCCGCACCTCATTCCT		
Fb	SGFb1	AGACACATTAAGTCGCACGATAG	147	Pantůček *et al.*, 2004
	SGFb2	TCTTCTCTGGCACGGTCTCTT		
vnitřní kontrola	SAU1	GACGGCTTTGATGGCTAGTGG	217	Štěpán *et al.*, 2001
	SAU2	AGTTAATTCACGCCCTAGTG		

3.5.4.2. Detekce podskupin serologické skupiny B

Detekce serologických podskupin Ba – Be je založena na PCR amplifikaci specifických částí genů pro portálový protein (Kahánková *et al.*, 2010). Podmínky PCR a elektroforézy jsou uvedeny v tabulce 7, složení PCR směsi v tabulce 8 a přehled použitých primerů v tabulce 9.

Tabulka 7: Podmínky multiplex PCR a elektroforézy

	Teplota (°C)	Čas
Počáteční denaturace	95	5´
Denaturace	94	1´
Připojení primerů	58	1´ 20´´
Prodlužování primerů	70	1´ 20´´
Závěrečné prodlužování primerů	72	5´
Počet cyklů	25	
Elektroforéza	1,8% gel, 5 V/cm	

Tabulka 8: Složení směsi pro multiplex PCR

Reagencie	Zásobní koncentrace	Výsledná koncentrace	Objem v jedné reakční směsi (µl)
deionizovaná H_2O	-	-	14,29
Taq pufr (5 PRIME, USA)	10×	1×	2,5
$MgCl_2$ (5 PRIME, USA)	50 mM	1,5 mM	0,75
dNTP	2 mM	0,2 mM	2,5
Primer SGBa1	100 µM	1 µM	0,25
Primer SGBa2	100 µM	1 µM	0,25
Primer SGBb1	100 µM	0,8 µM	0,2
Primer SGBb2	100 µM	0,8 µM	0,2
Primer SGBc1	100 µM	0,8 µM	0,2
Primer SGBc2	100 µM	0,8 µM	0,2
Primer SGBd1	100 µM	0,4 µM	0,1
Primer SGBd2	100 µM	0,4 µM	0,1
Primer SGBe1	100 µM	0,4 µM	0,1
Primer SGBe2	100 µM	0,4 µM	0,1
Perfect*Taq* DNA polymeráza (5 PRIME, USA)	5 U/ µl	1,5 U	0,3
Templátová DNA	50× ředěná	50 – 100 ng	3

Tabulka 9: Přehled použitých primerů

Název primeru	Nukleotidová sekvence (5´→ 3´)	Amplikon (bp)	Prototypový fág	Citace
SGBa1	AAGATGATAACTTTAGTGGCAC	400	ϕ11 (NC_004615)	Kahánková *et al.*, 2010
SGBa2	TCATTGATGTYTCTAGGGTC			
SGBb1	CTGATTATGTGTACGCAGAG	453	ϕ96 (NC_007057)	Kahánková *et al.*, 2010
SGBb2	TTCCGTTAAACTCGTCAGA			
SGBc1	TTGTTAAGGAACCYAAGCC	350	ϕETA (NC_003288)	Kahánková *et al.*, 2010
SGBc2	GCCTCTAATTCTTCGTGCTC			
SGBd1	AAGTTACGTCGCTGGC	204	ϕ71 (NC_007059)	Kahánková *et al.*, 2010
SGBd2	GCTTGTTCTGCTGGCACTCT			
SGBe1	AAATGAAACTATTCCGTGTT	253	ϕX2 (NC_007065)	Kahánková *et al.*, 2010
SGBe2	AAYGCTATAAAYGGYACTCT			

3.5.4.3. Multiplex PCR detekce ETA-B skupin

Multiplex PCR pro určení skupin ETA-B fágů a profágů dle Holochová *et al.* (2010b) byla rozšířena o primery navržené na pracovišti LMDM, Brno. Dodatečné primery byly navrženy dle sekvence genu s neznámou funkcí, lokalizovaném v 9. fragmentu *Hin*dIII restrikčního spektra ϕ166.

Podmínky PCR a elektroforézy jsou popsány v tabulce 10, složení PCR směsi v tabulce 11 a přehled použitých primerů je uveden v tabulce 12.

Tabulka 10: Podmínky multiplex PCR a elektroforézy

	Teplota (°C)	Čas
Počáteční denaturace	94	3´
Denaturace	94	45´
Připojení primerů	56	1´
Prodlužování primerů	72	2´
Závěrečné prodlužování primerů	72	7´
Počet cyklů	30	
Elektroforéza	2,5% gel, 5 V/cm	

Tabulka 11: Složení směsi pro multiplex PCR

Reagencie	Zásobní koncentrace	Výsledná koncentrace	Objem v jedné reakční směsi (µl)
deionizovaná H_2O	-	-	9,65
FastStart PCR Master (Roche Diagnostics, SRN)	2×	1×	12,5
Primer ETA1-02	100 µM	1 µM	0,25
Primer ETA1-06	100 µM	1 µM	0,25
Primer ETA2-11	100 µM	0,6 µM	0,15
Primer ETA2-14	100 µM	0,6 µM	0,15
Primer ETA3-14	100 µM	0,6 µM	0,15
Primer ETA-66F	100 µM	0,6 µM	0,15
Primer ETA-66R	100 µM	0,6 µM	0,15
Primer ETA3xis-1	100 µM	0,8 µM	0,2
Primer ETA3xis-2	100 µM	0,8 µM	0,2
Primer SAU1	100 µM	0,2 µM	0,05
Primer SAU2	100 µM	0,2 µM	0,05
Primer 166 F	100 µM	0,2 µM	0,05
Primer 166 R	100 µM	0,2 µM	0,05
Templátová DNA	neředěná	500 – 1000 ng	1

Tabulka 12: Přehled použitých primerů

Název	Nukleotidová sekvence (5´→ 3´)	Amplikon (bp)	Specifita	Citace
ETA1-02	AAATTAGGTCTAGCTGCGTCAGT	1200	ϕETA: *orf02 - orf06*	Holochová *et al.*, 2010b
ETA1-06	TAATGTCAATGGTTGCGTCTCT			
ETA2-14	CGTATTTCTTCATCGCAGACA	753	ϕETA2: *orf11 – orf14* (ETA2-11; ETA2-14)	
ETA3-14	TCTGATGCCATATCTAAGTC	537	ϕETA: *orf13 - orf15* (ETA2-11; ETA3-14)	
ETA2-11	GGATACATTGCGATACGAGGCAG	844	ϕETA3: *orf11 - orf14* (ETA2-11; ETA3-14)	
ETA-66F	ATACAGATGATAACGGTAATACT	425	ϕETA: *orf66* (pozitivní kontrola genu *eta*)	
ETA-66R	ATAATTCCCAATACCAACAC			
ETA3xis-1	ACGTTTGTTATTACCGTATA	380	ϕETA3: *orf01 - orf02*	
ETA3xis-2	GACGAAATAGCTAAGCTGT			
SAU1	GACGGCTTTGATGGCTAGTGG	217	vnitřní kontrola sekvencí *S. aureus*	Štěpán *et al.*, 2001
SAU2	AGTTAATTCACGCCCTAGTG			
166 F	TTCGATAACGATAGATACGC	306	ϕ166	LMDM, Brno
166 R	TCCTTTGTGATTTTCCAATAAT			

3.5.4.4. PCR genotypizace

Pro PCR detekci vybraných genů byly využity následující primery:

a) Primery navržené podle genomu ϕETA (AP001553) pro amplifikaci genu pro integrázu (*int*), *orf2*, velkou podjednotku terminázy (*terL*), portálový protein (*por*), *orf57 – 58*, *orf62 – 63*, holin (*hol*), amidázu (*ami*) a exfoliativní toxin A (*eta*) (Holochová *et al*., 2010a).

b) Primery navržené podle genomu fága ϕETA3 (AP008954) pro amplifikaci genu pro excizionázu (*xis*) (Holochová *et al*., 2010a).

c) Dva páry primerů byly navrženy podle sekvence segmentů P2 (GQ338076) a C4 (GQ330877) fága ϕ557 (Holochová *et al*., 2010a).

d) Primery pro detekci fágového represoru fága ϕ234 (sekvence R234) a genu s neznámou funkcí fága ϕ166 (sekvence P166) navržené na pracovišti LMDM, Brno.

e) Primery pro detekci *orf43* (sekvence ETA2-18) fága ϕETA2, kódující portálový protein, navržené v této práci.

PCR směs pro detekci genů a), b) a c) byla shodná a je uvedena v tabulce 13. Přehled použitých primerů je uveden v tabulce 14 a podmínky PCR reakcí jsou popsány v tabulce 15.

Složení směsi pro PCR detekci sekvence R234 je uvedeno v tabulce 16, přehled primerů v tabulce 17 a podmínky PCR v tabulce 18.

Složení směsi pro PCR detekci sekvence P166 je uvedeno v tabulce 19, přehled primerů v tabulce 20 a podmínky PCR v tabulce 21.

Složení směsi pro PCR detekci sekvence ETA2-18 je uvedeno v tabulce 22, přehled primerů v tabulce 23 a podmínky PCR v tabulce 24.

Tabulka 13: Složení směsí pro PCR detekci genů

Reagencie	Zásobní koncentrace	Výsledná koncentrace	Objem v jedné reakční směsi (µl)
deionizovaná H_2O	-	-	13,25
Taq PCR pufr (5 PRIME, USA)	10×	1×	2,5
$MgCl_2$ (5 PRIME, USA)	25 mM	1,5 mM	1,5
dNTP	2 mM	0,2 mM	2,5
Primer 1	10 µM	0,4 µM	1
Primer 2	10 µM	0,4 µM	1
Taq polymeráza (5 PRIME, USA)	5 U/µl	1,25 U	0,25
Templátová DNA	50× ředěná	50 – 100 ng	3

Tabulka 14: Přehled použitých primerů

Gen	Název	Nukleotidová sekvence (5´→ 3´)	Amplikon (bp)	Citace
int	int-F	ATAACACAAAATCAATGC	582	Yamaguchi *et al.*, 2000
	int-R	GTTATAATGGGGAAAAGC		
int-orf2	int-ORF2-F	ATAGCTTCGCCAATCCTC	949	Holochová *et al.*, 2010a
	int-ORF2-R	ACTTAACAACATTCGCCAGA		
xis	int-xis-F	ACGTTTGTTATTACCGTATA	380	
	int-xis-R	GACGAAATAGCTAAGCTGT		
orf13-15 (P2)	P2-F	AGCTAAAGAACTTGCGGTAA	625	
	P2-R	TCTGATGCCATATCTAAGTC		
terL	ter-F	ATAAATCTAACGCAGTCAAA	547	
	ter-R	TCCGCTACAACCATAAT		
por	por-F	GCTACAGGAGCAGTTGACCC	589	
	por-R	TGGATAAATCGGATAATCG		
orf42-44 (C4)	C4-F	AATTCTTCGTGGCGTTGCAC	505	
	C4-R	CAGGCTTAGACGACGCAAAT		
orf57-58	ORF57-58-F	ACTTATCCAGGTGGYGTTATTG	405	Pantůček *et al.*, 2004
	ORF57-58-R	TGTATTTAATTTCGCCGTTAGTG		
orf62-63	ORF62-63-F	GGTAAAAACGGTACTGTAGT	690	Holochová *et al.*, 2010a
	ORF62-63-F	TGTATATTCTTCGCCTTCGT		
hol	hol-F	ATGGATATCGGTACAAT	277	Yamaguchi *et al.*, 2000
	hol-R	CTAACCGACGGCATTGT		
ami	ami-F	CGCATACTCTAACGACCC	573	Holochová *et al.*, 2010a
	ami-R	GTGCTTGGCTTACTACTTGG		
eta	eta-F	CTATTTACTGTAGGAGCTAG	741	Yamaguchi *et al.*, 2000
	eta-R	ATTTATTTGATGCTCTCTAT		

Tabulka 15: Podmínky PCR a elektroforézy

Amplifikovaná sekvence >	*int*		*int-orf*		*xis*		*P2*		*terL*		*por*	
	°C	čas	°C	čas	°C	čas	°C	čas	°C	čas	°C	čas
Počáteční denaturace	94	3´	94	3´	94	3´	94	3´	94	3´	94	3´
Denaturace	94	1´	94	30´´	94	30´´	94	30´´	94	30´´	94	30´´
Připojení primerů	60	30´´	59	30´´	59	30´´	59	30´´	53	30´´	53	30´´
Prodlužování primerů	72	35´´	72	28´´	72	28´´	72	40´´	70	38´´	70	40´´
Závěrečné prodlužování primerů	72	5´	72	5´	72	5´	72	5´	72	5´	72	5´
Počet cyklů	30		25		25		25		25		25	
Amplifikovaná sekvence >	***C4***		***orf57-58***		***orf62-63***		***hol***		***ami***		***eta***	
	°C	čas	°C	čas	°C	čas	°C	čas	°C	čas	°C	čas
Počáteční denaturace	94	3´	94	3´	94	3´	94	3´	94	3´	94	3´
Denaturace	94	30´´	94	30´´	94	30´´	94	30´´	94	30´´	94	1´
Připojení primerů	62	30´´	57	30´´	57	30´´	60	30´´	55	30´´	60	30´´
Prodlužování primerů	70	35´´	68	30´´	68	45´´	72	20´´	72	40´´	72	45´´
Závěrečné prodlužování primerů	70	5´	70	5´	70	5´	70	5´	70	5´	70	5´
Počet cyklů	25		30		25		25		25		30	
Elektroforéza	1,2% gel, 5 V/cm											

Tabulka 16: Složení směsi pro PCR detekci sekvence R234

Reagencie	Zásobní koncentrace	Výsledná koncentrace	Objem v jedné reakční směsi (µl)
deionizovaná H_2O	-	-	16,5
ThermoPol pufr (BioLabs Inc., UK)	10×	0,75×	1,875
dNTP	2 mM	0,2 mM	2,5
Primer 234 F	10 µM	0,2 µM	0,5
Primer 234 R	10 µM	0,2 µM	0,5
Taq DNA polymeráza (BioLabs Inc., UK)	5 U/µl	0,625 U	0,125
Templátová DNA	50× ředěná	50 – 100 ng	3

Tabulka 17: Přehled použitých primerů

Název	Nukleotidová sekvence (5´→ 3´)	Amplikon (bp)	Prototypový fág	Citace
234 F	TCCGTAATTTGTGCAATTCAA	249	ϕ234[a]	LMDM,Brno
234 R	GTGCCTCCGTCATATTTTC			

[a] Primery byly navrženy podle sekvence 13. fragmentu *Hin*dIII restrikčního spektra fága ϕ234

Tabulka 18: Podmínky PCR pro detekci sekvence R234 a elektroforézy

Amplifikovaná sekvence: R234	Teplota (°C)	Čas
Počáteční denaturace	94	3´
Denaturace	94	30´´
Připojení primerů	60	30´´
Prodlužování primerů	72	30´´
Závěrečné prodlužování primerů	72	5´
Počet cyklů	30	
Elektroforéza	1,2% gel, 5 V/cm	

Tabulka 19: Složení směsi pro PCR detekci sekvence P166

Reagencie	Zásobní koncentrace	Výsledná koncentrace	Objem v jedné reakční směsi (µl)
deionizovaná H_2O	-	-	13,25
Taq PCR pufr (5 PRIME, USA)	10×	1×	2,5
$MgCl_2$ (5 PRIME, USA)	25 mM	2,5 mM	2,5
dNTP	2 mM	0,2 mM	2,5
Primer 166 F	10 µM	0,2 µM	0,5
Primer 166 R	10 µM	0,2 µM	0,5
Taq polymeráza (5 PRIME, USA)	5 U/µl	1,25 U	0,25
Templátová DNA	50× ředěná	50 – 100 ng	3

Tabulka 20: Přehled použitých primerů

Název primeru	Nukleotidová sekvence (5´→ 3´)	Amplikon (bp)	Prototypový fág	Citace
166 F	TTCGATAACGATAGATACGC	306	ϕ166[a]	LMDM,Brno
166 R	TCCTTTGTGATTTTCCAATAAT			

[a] Primery byly navrženy podle sekvence 9. fragmentu *Hin*dIII restrikčního spektra fága ϕ166

Tabulka 21: Podmínky PCR pro detekci sekvence P166 a elektroforézy

Amplifikovaná sekvence: P166	Teplota (°C)	Čas
Počáteční denaturace	94	3´
Denaturace	94	30´´
Připojení primerů	56	30´´
Prodlužování primerů	72	30´´
Závěrečné prodlužování primerů	72	5´
Počet cyklů	25	
Elektroforéza	1,2% gel, 5 V/cm	

Tabulka 22: Složení směsi pro PCR detekci sekvence ETA2-18

Reagencie	Zásobní koncentrace	Výsledná koncentrace	Objem v jedné reakční směsi (µl)
deionizovaná H_2O	-	-	9,5
FastStart PCR Master (Roche Diagnostics, SRN)	2×	1×	12,5
Primer ETA2-18 F	10 µM	0,4 µM	1
Primer ETA2-18 R	10 µM	0,4 µM	1
Templátová DNA	neředěná	500 – 1000 ng	1

Tabulka 23: Přehled použitých primerů

Název primeru	Nukleotidová sekvence (5´→ 3´)	Amplikon (bp)	Prototypový fág	Citace
ETA2-18 F	CGTAATAGTATCGCAGGCGT	147	ϕETA2[a]	Navrženo v této práci
ETA2-18 R	TGGTGTGAGCTTCAATCCAT			

[a] Primery navrženy dle sekvence 18. fragmentu *Hin*dIII restrikčního spektra fága ϕETA2 (AP008953)

Tabulka 24: Podmínky PCR pro detekci sekvence ETA2-18 a elektroforézy

Amplifikovaná sekvence: ETA2-18	Teplota (°C)	Čas
Počáteční denaturace	94	3´
Denaturace	94	30´´
Připojení primerů	62	30´´
Prodlužování primerů	68	30´´
Závěrečné prodlužování primerů	70	5´
Počet cyklů	25	
Elektroforéza	1,2% gel, 5 V/cm	

3.5.5. Klonování restrikčního fragmentu do vektoru pBluescript SK−

Pro klonování 12. fragmentu *Hin*dIII restrikčního spektra genomu ϕ236 byl použit plazmidový vektor pBluescript SK−.

3.5.5.1. Příprava kompetentních buněk

Jako recipientní kmen rekombinantních plazmidů byl použit kmen bakterií *E. coli* Top 10F, stav kompetence byl navozen pomocí $CaCl_2$.

1. Naočkovat 20 µl rozmrazené kultury buněk *E. coli* Top 10F do 20 ml LB bujónu a inkubovat 18 hod. při 37 °C.
2. Naočkovat 20 ml v LB bujónu narostlé kultury do 200 ml LB bujónu v Erlenmayerově baňce a inkubovat v třepacím termostatu přibližně 2 hod./37 °C/151 rpm do hustoty suspenze OD_{600} = 0,3.
3. Umístit buněčnou kulturu do ledové vodní lázně a vytemperovat na 0 °C.
4. Přenést buněčnou kulturu do 20ml centrifugační zkumavky.
5. Centrifugovat 10 min./3000 rpm při 4 °C.
6. Supernatant odlít, sediment resuspendovat v 1/2 původního objemu (10 ml) ledového roztoku 0,05 M $CaCl_2$. Uložit na led do lednice do druhého dne.
7. Centrifugovat 10 min./3000 rpm při 4 °C.
8. Supernatant odlít, sediment resuspendovat v 1/2 původního objemu (10 ml) ledového roztoku 0,05 M $CaCl_2$.
9. Rozplnit suspenzi buněk po 200 µl do Eppendorfových mikrozkumavek (tímto způsobem připravené buňky lze používat přibližně týden). Pro dlouhodobé uchovávání přidat k buněčné suspenzi 1/10 objemu sterilního vychlazeného glycerolu (4 °C) a uchovávat při – 70 °C.
10. Pro kontrolu životaschopnosti naočkovat připravené kompetentní buňky na plotnu s LBA bez ampicilinu, IPTG a X-gal.

3.5.5.2. Příprava plazmidového vektoru pBluescript SK−

Vektor pBluescript SK− byl izolován z kmene *E. coli* Top 10F, který tento plazmid obsahoval. Izolace proběhla pomocí komerčního kitu High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche Diagnostics, SRN) dle pokynů výrobce.

- **Štěpení vektoru pBluescript SK− restrikční endonukleázou *Hin*dIII:**

1. Do 1,5 ml Eppendorfovy zkumavky byla namíchána restrikční směs (4×):
   5 µl deionizované H_2O
   2 µl pufru B
   13 µl izolované plazmidové DNA (2 µg)
   5 U restriktázy *Hin*dIII (0,5 µl)
   Směs inkubovat 4 hod./37 °C.
2. Do restrikční směsi přidat další 5 U restriktázy *Hin*dIII (0,5 µl).
3. Inkubovat přes noc při 37 °C.

- **Defosforylace vektoru:**

1. Do 1,5 ml Eppendorfovy zkumavky byla namíchána defosforylační směs:
   4 µl defosforylačního pufru
   33 µl štěpené vektorové DNA (3 µg)
   30 U alkalické fosfátázy (3 µl)
2. Směs inkubovat 1 hod./37 °C.
3. Přečištění DNA pomocí elektroforézy na 1,2% agarózovém gelu (5 V/cm). Po vyřezání z gelu extrakce pomocí komerčního kitu QIAEX®II Gel Extraction Kit (QIAGEN, SRN) dle pokynů výrobce.

3.5.5.3. Příprava vybraných restrikčních fragmentů ke klonování

Ke klonování byl vybrán jedinečný 12. fragment *Hin*dIII restrikčního spektra DNA bakteriofága ϕ236. Přibližná velikost fragmentu činí 1040 bp (měřeno v programu ANAGEL 1.2). Pro zvýšení celkového množství izolovaného fragmentu bylo připraveno šest restrikčních směsí.

1. Do 1,5 ml Eppendorfovy zkumavky byla namíchána restrikční směs:
   8 µl deionizované H_2O
   2 µl pufru B
   10 µl ředěného roztoku fágové DNA (2 µg)
   5 U restriktázy *Hin*dIII (0,5 µl)
2. Směs inkubovat 4 hod./37 °C.
3. Do restrikční směsi přidat další 5 U restriktázy *Hin*dIII (0,5 µl).
4. Inkubovat přes noc při 37 °C.
5. Provést elektroforézu na agarózovém gelu (1,2% SeaKem GTG agaróza, 5 V/cm).
6. Vybraný fragment vyřezat z gelu a přečistit komerčním kitem QIAEX®II Gel Extraction Kit (QIAGEN, SRN) dle pokynů výrobce.
7. Zahustit roztok izolovaného restrikčního fragmentu na vakuové odparce.

3.5.5.4. Ligace vybraných restrikčních fragmentů s vektorem pBluescript SK−

Složení ligačních směsí vycházelo z pokynů komerčního kitu Quick Ligation Kit (BioLabs Inc., UK). Nejvyšší účinnost ligace se uvádí při poměru 3:1 v trojmolárním nadbytku DNA inzertu vůči DNA vektoru. Výchozí množství DNA vektoru ve směsi bylo 50 ng.

1. Připravit ligační směs v molárním poměru 3:1, při výchozím množství vektorové DNA 50 ng.
2. Přidat 2× Quick ligační pufr a T4-DNA ligázu (10 µl ligační směsi + 10 µl pufru + 1 µl ligázy)
3. Inkubovat při pokojové teplotě 30 min.

3.5.5.5. Transformace kompetentních buněk *E. coli* rekombinantní DNA

1. Umístit Eppendorfovy zkumavky s 200 µl kompetentních buněk do ledové lázně (nechat pomalu rozmrznout při pokojové teplotě, pokud byly uchovávány při – 70 °C).
2. K buňkám přidat celý objem ligační směsi a dále připravit kontroly: kompetentní buňky + 1 µl neštěpeného vektoru a kompetentní buňky + 3 µl štěpeného vektoru.

3. Lehce promíchat a nechat 30 min. v ledové lázni.
4. Ponořit Eppendorfovy zkumavky na 1 min. do vodní lázně o teplotě 42 °C.
5. Umístit Eppendorfovy zkumavky opět do ledové lázně.
6. Přidat 1 ml LB bujónu a inkubovat 1 hod. při 37 °C v třepacím dry-heateru.
7. Centrifugace 1 min./6000 rpm.
8. Supernatant odlít, ve zkumavce zůstane cca. 100 µl LB bujónu, v něm resuspendovat buněčný sediment.
9. Suspenzi buněk naočkovat pomocí bakteriologické hokejky na selekční plotny s LBA:
   Selekce na ampicilin (výsledná koncentrace ampicilinu 100 µg/ml)
   Modro-bílý test - selekce pomocí IPTG (výsledná koncentrace IPTG 0,5 mM)
   - selekce pomocí X-gal (výsledná koncentrace X-gal 40 µg/ml)
11. Inkubovat 24 – 48 hod./37 °C.
12. Bílé kolonie, které obsahují rekombinantní plazmid, přečárkovat na selekční plotny s LBA, ampicilinem, IPTG a X-gal.
13. Inkubovat 24 – 48 hod./37 °C.

- **Zmrazení nárůstu kolonií *E. coli* obsahujících rekombinantní vektorovou DNA:**

1. Z vybraných bílých kolonií provést křížový roztěr na selekční plotny s LBA, ampicilinem, IPTG a X-gal.
2. Inkubovat 24 hod./37°C.
3. Do Eppendorfovy zkumavky odebrat 2 kličky bakteriálního nárůstu.
4. Přidat 400 µl HMFM média a kulturu uchovávat při – 70 °C.

3.5.5.6. Příprava rekombinantní vektorové DNA k sekvenaci

1. Při pokojové teplotě rozmrazit kulturu buněk obsahující rekombinantní DNA.
2. Naočkovat 20 µl kultury do 20 ml LB bujónu + 20 µl ampicilinu (100 mg/ml).
3. Třepat 24 hod./37 °C.
4. Izolovat rekombinantní DNA pomocí komerční kitu NucleoSpin Plasmid (Macherey-Nagel, SRN) s těmito modifikacemi vůči pokynům výrobce:
   a) v 1. kroku centrifugace 7 ml buněčné kultury 15 min. při 4000 rpm a 10 °C.
   b) v posledním kroku přidat 25 µl AE pufru, nechat 3 min. odstát, centrifugovat a přidat dalších 25 µl AE pufru a centrifugovat.

- **Ověření přítomnosti inzertu v izolované DNA rekombinantního vektoru pomocí restrikčního štěpení:**

1. Do 1,5 ml Eppendorfovy zkumavky byla namíchána restrikční směs:
   8 µl deionizované H_2O
   2 µl pufru B
   10 µl ředěného roztoku DNA rekombinantního vektoru (2 µg)
   10 U restriktázy *Hin*dIII (1 µl)
   Inkubovat směs přes noc při 37 °C.
2. Výsledek restrikčního štěpení ověřit elektroforézou na 1,2% agarózovém gelu v 1× TAE (20 ml 50× TAE, 980 ml destilované H2O) při napětí 5 V/cm.

3.5.6. Sekvenace rekombinantní vektorové DNA a analýza dat

Izolovaná vektorová DNA obsahující klonovaný 12. restrikční fragment fága ϕ236 byla připravena dle pokynů (15 µl DNA o koncentraci 100 ng/µl) a odeslána na sekvenaci, kterou provedla firma Eurofins MWG Operon (SRN).

Sekvence 12. fragmentu *Hin*dIII restrikčního spektra ϕ236 byla sekvenována pomocí primerů M13 uni (-21) (TGTAAAACGACGGCCAGT) a M13 rev (-29) (CAGGAA ACAGCTATGACC).

Získané sekvence byly složeny, očištěny od částí vektorové sekvence programem VecScreen (NCBI, USA) a dále analyzovány pomocí výše zmíněných počítačových programů (kapitola 3.4.).

3.5.7. Lyzogenizace

1. Naočkovat 20 µl rozmrazené kultury buněk kmene *S. aureus* 1039 do 20 ml MPB, inkubovat 18 hod./37 °C.
2. Přidat 2 ml narostlé kultury do 50 ml MPB v provzdušňovací lahvi a provzdušňovat 2 hod. při 37 °C do hustoty OD_{600} = 0,3 (cca 10^9 CPM).
3. K narostlé kultuře přidat 5 – 6 ml lyzátu lyzogenujícího fága (titr 10^{10-11} PFU) a 5 ml 0,02 M $CaCl_2$.

4. Nechat lyzovat přibližně 2 hod. při 37 °C za provzdušňování (ne do úplné lyze), poté nechat do druhého dne v chladu a ve tmě.
5. Centrifugace 15 min./4500 rpm, odlít supernatant.
6. Sediment 2× promýt v 5 ml sterilního promývacího lyzogenizačního roztoku (0,15 M NaH_2PO_4; 0,15 M Na_2HPO_4; 0,01 M citrát sodný).
7. Resuspendovat sediment v 1 ml MPB, naředit fyziologickým roztokem na 10^0, 10^{-1}, 10^{-2}.
8. Z každého ředění naočkovat 0,1 ml na 3 misky s MPA s 0,01 M citrátem sodným a rozetřít skleněnou hokejkou.
9. Kultivovat 18 hod./37 °C.
10. Přečárkovat sterilním párátkem jednotlivé kolonie (výběr alespoň 40 kolonií) na MPA s 0,01 M citrátem sodným, kultivovat 20 hod./37 °C.
11. Celkem 3 × pasážovat na MPA s 0,01 M citrátem sodným. Vždy kultivovat 20 hod./37 °C, při poslední pasáži očíslovat jednotlivé izoláty.
12. Provést test na rezistenci k lyzogenizujícímu fágu. Na misku s MPA (bez citrátu!) naočkovat kličkou nebo sterilním párátkem kultury čárky (čárky označit čísly stejnými jako izoláty z bodu 11). Na 1 misku 5 čárek, na ně nakápnout 10 µl lyzátu původního lyzogenizujícího fága. Kultivovat 20 hod./37 °C a v případě potřeby dále 72 hod./25 °C.
13. U rezistentních kultur připravit hrubé buněčné lyzáty a provést PCR pro detekci genu *eta*.
14. Vybrané lyzogenní kmeny zamrazit a podrobit je DNA analýze, případně odeslat na fenotypizaci.

3.5.7.1. Příprava hrubého buněčného lyzátu

1. Do Eppendorfovy zkumavky s 500 µl 2 × YT média naočkovat 1 kličku kultury z pevného média, inkubace na třepacím dry-heatru 3 hod./37°C.
2. Centrifugace 3 min./12 000 rpm, odsát supernatant.
3. Kulturu promýt v 1 ml sterilní destilované H_2O, opět centrifugace 3 min./12 000 rpm, odsát supernatant a opakovat promytí.
4. Vytemperovat dry-heater na 80 °C, inkubace 20 min.
5. Před použitím centrifugovat 3 min./14 000 rpm (jako templát v PCR směsi použít 3 µl buněčného lyzátu).

3.5.8. PFGE

1. Naočkovat 20 µl rozmrazené kultury buněk do 20 ml 2 × YT média, inkubovat 18 hod./37 °C.
2. Ke kultuře přidat 200 µl 0,5 M EDTA, vychladit v lednici na 4 °C.
3. Odebrat 10 ml suspenze, centrifugace 15 min./4 500 rpm při 4 °C.
4. 2× promýt v 5 ml vychlazeného promývacího pufru na PFGE (10 mM Tris-Cl; 10 mM EDTA; 10mM EGTA; 1 M NaCl).
5. Naředit sediment v 15 ml promývacího pufru na PFGE, OD_{600} = 0,2 – 0,25.
6. Centrifugace 15 min./4 500 rpm při 4 °C, odpipetovat supernatant.
7. Resuspendovat sediment ve 150 µl promývacího pufru na PFGE, přenést do Eppendorfovy zkumavky.
8. Zkumavky nahřát na 55 °C, 2 – 3 min. a přidat 15 µl lyzostafinu (0,5 mg/ml) a 150 µl rozvařené 2% low-melting point agarózy vytemperované na 55 °C.
9. Obsah zkumavek přepipetovat do tvořítek na tvorbu bločků, nechat zatuhnout 20 min. při 4 °C.
10. Přenést bločky do 1 ml lyzačního roztoku (6 mM Tris.Cl; 100 mM EDTA; 1 M NaCl; 0,5% lauroylsarkosin; 0,2% Na-deoxycholát; pH = 7,6) s přídavkem 20 µl lyzostafinu (0,5 mg/ml), inkubovat ve vodní lázni za mírného třepání 2 – 3 hod./37 °C. Do dalšího dne nechat v lednici.
11. Slít lyzační roztok a přidat 1 ml deproteinizačního roztoku (25 mM EDTA; 25 mM EGTA; 1% N-lauroylsarkosin; pH = 9,0) s přídavkem 25 µl proteinázy K (20 mg/ml), inkubovat ve vodní lázni za mírného třepání 6 hod./55 °C, po 6 hod. vyměnit deproteinizační roztok a proteinázu K a pokračovat v inkubaci dalších 6 hod.
12. Bločky 5 – 7 × promýt (po 1,5 – 2 hod.) v 10 ml 1 × TE pufrovacím roztoku (pH = 8,0) při 4 °C.
13. Bločky skladovat v TE pufru (pH = 8,0) při 4 °C, pufr jednou za měsíc vyměnit.
14. Nařezat bločky na pásky (o síle asi 1 mm), dát do Eppendorfovy zkumavky (2 pásky), přidat 68 µl H_2O, 8 µl pufru A a 0,8 µl *Sma*I restriktázy. Štěpit přes noc při 25 °C.
15. Nanést nařezané bločky do jamek agarózového gelu (1,2%) a zalít 1% low-melting point agarózou. Podmínky PFGE: 1× TAE pufr, 5 V/cm-1, pulzní časy od 1´´ do 55´´ po 24 hod., 14°C.
16. Obarvit gel v roztoku ethidiumbromidu (1 µg/ml) 1 – 2 hod., odbarvit v destilované H_2O a fotografovat pod UV světlem o vlnové délce 302 nm.

4. VÝSLEDKY

4.1. Izolace fágů ϕ236 a ϕ841

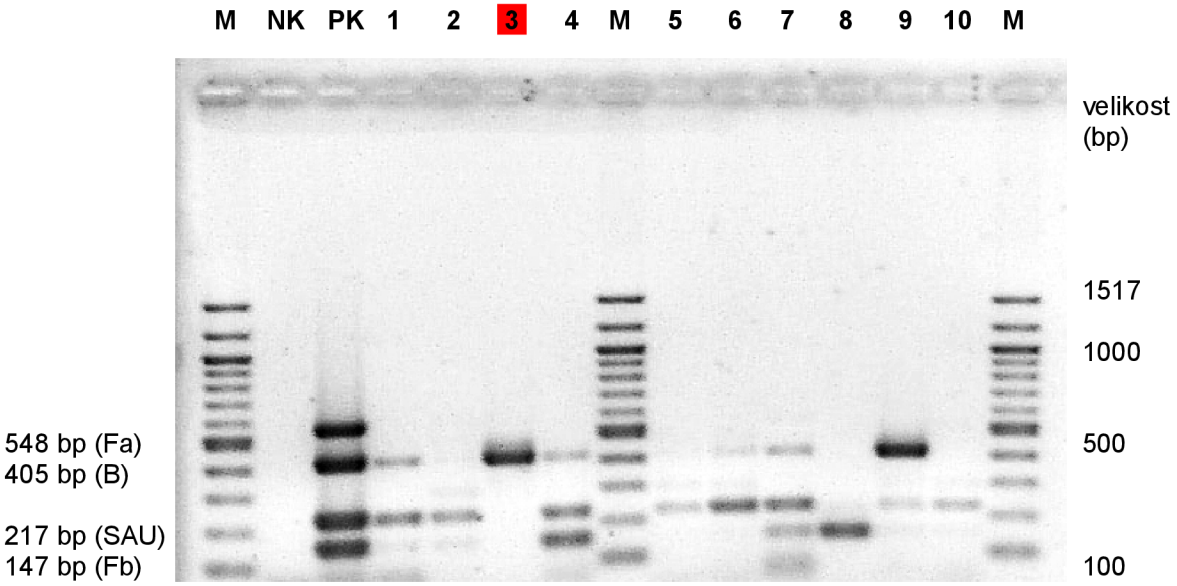
Pro izolaci dosud nepopsaných ETA-konvertujících bakteriofágů byly vybrány klinické kmeny *S. aureus* obsahující *eta*-pozitivní profágy, které jsou geneticky dobře charakterizovány a uloženy na pracovišti Laboratoře molekulární diagnostiky mikroorganismů (LMDM). Kmeny *S. aureus* 08/236 i 06/841 obsahují dva profágy, typu B a Fb. Nejvhodnější podmínky indukce excize profágů a dosažené titry indukovaných lyzátů jsou uvedeny v tabulce 25.

Tabulka 25: Podmínky indukce excize profágů z klinických kmenů

Kmen	Podmínky indukce	Titr fága (PFU/ml)
08/236	50 cm / 30 s	7×10^5
06/841	50 cm / 35 s	1×10^6

Metodou izolace z jedné plaky byly získány čisté lyzáty fágových částic. Pomocí multiplex PCR byly fágy identifikovány jako členové seroskupiny B a označeny jako ϕ841 a ϕ236. Elektroforetogram detekce fága ϕ841 z lyzátu kmene 06/841 je zobrazen na obrázku 9.

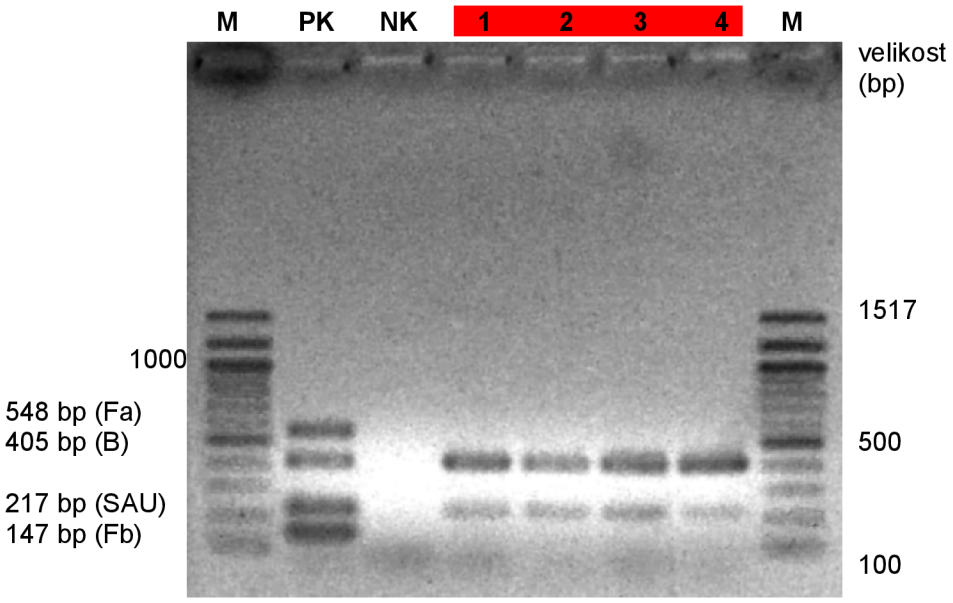
Obrázek 9: Multiplex PCR detekce seroskupin Fa, Fb a B u lyzátů kmene 06/841



M: 100 bp **NK**: kmen *S. aureus* 1039 - negativní kontrola ■: vzorek s hledanými vlastnostmi
PK: kmen *S. aureus* PS47 - pozitivní kontrola 4 profágových seroskupin **1 – 10**: lyzáty kmene 06/841

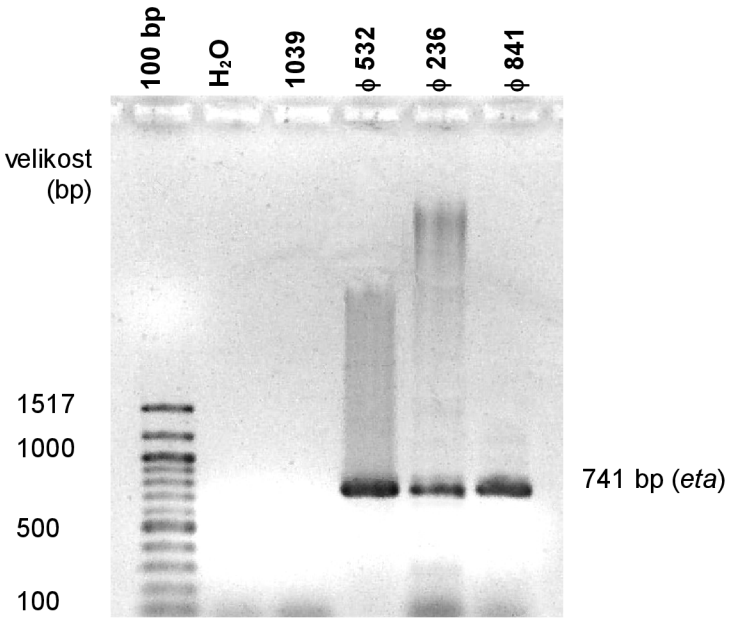
Elektroforetogram detekce fága ϕ236 z lyzátu kmene 08/236 je zobrazen na obrázku 10. U získaných izolátů ϕ841 a ϕ236 byla metodou PCR ověřena přítomnost genu *eta* v genomu obou fágů (obrázek 11).

Obrázek 10: Multiplex PCR detekce seroskupin Fa, Fb a B u lyzátů kmene 08/236



M: 100 bp **NK**: kmen *S. aureus* 1039 - negativní kontrola ■: vzorek s hledanými vlastnostmi
PK: kmen *S. aureus* PS47 - pozitivní kontrola 4 profágových seroskupin **1 – 4**: lyzáty kmene 08/236

Obrázek 11: PCR detekce genu *eta* u vybraných lyzátů kmene 06/841 a 08/236



H_2O: negativní kontrola **Kmen 1039** : negativní kontrola **DNA ϕ532**: pozitivní kontrola

4.2. Izolace DNA ϕ236 a ϕ841

Fenol-chloroformovou metodou byla izolována DNA indukovaných fágů ϕ236 a ϕ841. Od každého z nich byly získány dva vzorky DNA o objemu přibližně 0,5 ml. Koncentrace jednotlivých vzorků DNA jsou uvedeny v tabulce 26. Průměrný poměr hodnot absorbancí A260/A280 byl u DNA ϕ236 1,85 a u ϕ841 1,82. Průměrný poměr A260/A230 byl 2,22 pro DNA obou fágů. Izolované DNA tedy měly relativně vysokou čistotu vhodnou k další analýze.

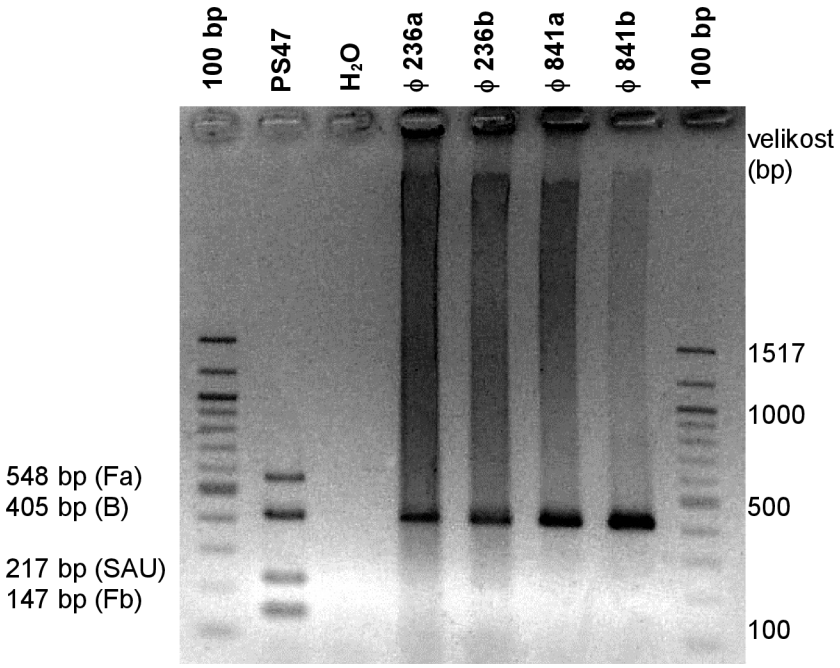
Tabulka 26: Koncentrace izolované DNA fágů ϕ236 a ϕ841

Fág	Vzorek	Koncentrace (µg/ml)
ϕ236	a	1 144
	b	1 070
ϕ841	a	630
	b	120

4.3. Detekce seroskupin fágů metodou multiplex PCR

Metodou PCR byly fágy ϕ236 a ϕ841 zařazeny do seroskupiny B (obr. 12). Fág ϕ236 byl dále zařazen do podskupiny Bc, fág ϕ841 do podskupiny Ba (obr. 13).

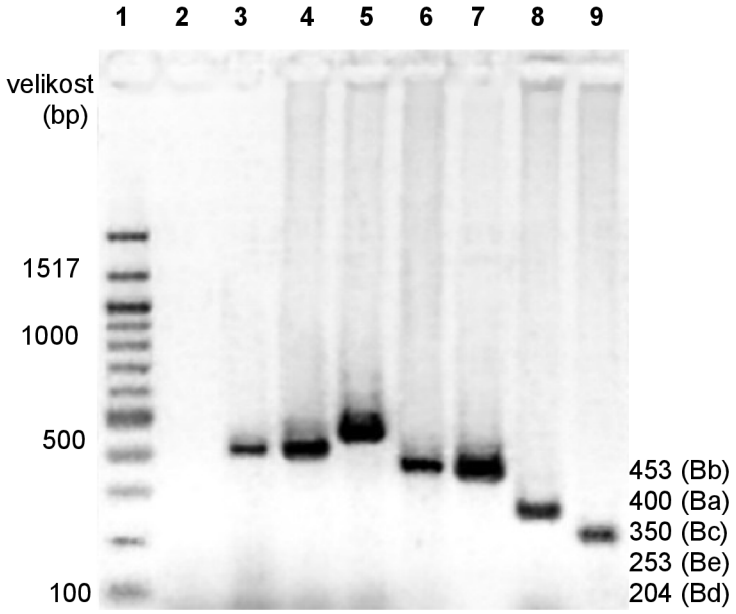
Obrázek 12: Multiplex PCR detekce seroskupin Fa, Fb a B u DNA fágů ϕ236 a ϕ841



H_2O : negativní kontrola

Kmen PS47 : pozitivní kontrola na 4 profágové seroskupiny

Obrázek 13: Multiplex PCR detekce variant fágové seroskupiny B fágů ϕ236 a ϕ841



1: 100 bp

2: H_2O - negativní kontrola

3: ϕ423 (Ba)

4: ϕ841

5: ϕ122 (Bb)

6: ϕ236

7: ϕ532 (Bc)

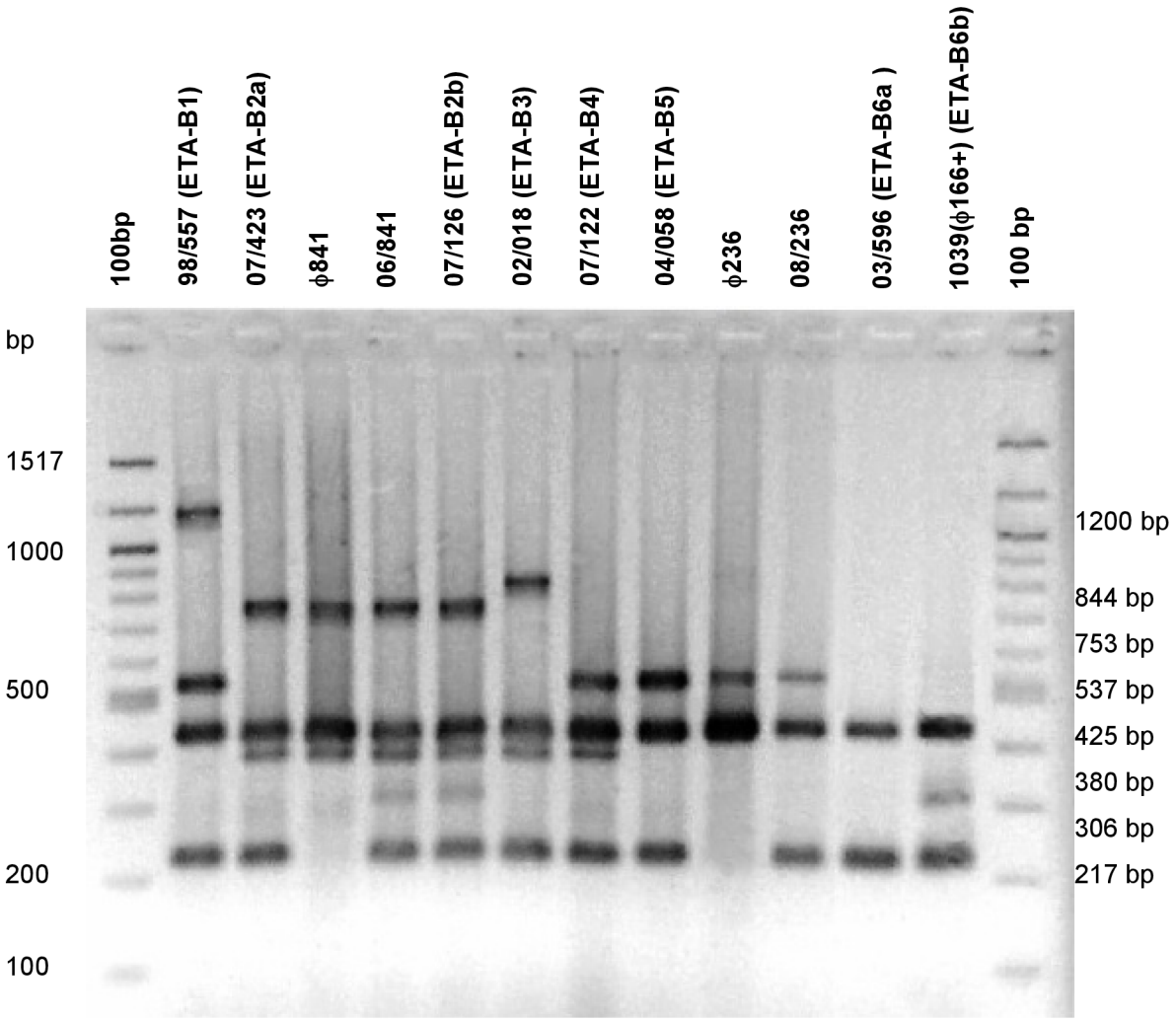
8: ϕX2 (Be)

9: *S. aureus* 1039(71+) (Bd)

4.4. Zařazení fágů ϕ236 a ϕ841 do ETA-B skupiny

Použitím metody multiplex PCR vyvinuté pro zařazení *eta*-pozitivních fágů a profágů do ETA-B skupin (Holochová *et al*., 2010b), která byla dále rozšířena na pracovišti LMDM, bylo možné zařadit fága ϕ236 do skupiny ETA-B5 a ϕ841 do skupiny ETA-B2 (podskupina B2a). Srovnání s fágy a kmeny *S. aureus* dalších skupin je zobrazeno na obrázku 14. Donorový kmen 06/841 se jeví jako typ B2b.

Obrázek 14: Multiplex PCR detekce skupin ETA-B fágů a profágů



Velikost amplifikovaných úseků sekvencí a genů je uvedena v tabulce 12. Vnitřní kontrola sekvencí *S. aureus* je identifikovatelná amplikonem o velikosti 217 bp, gen *xis* amplikonem o velikosti 380 bp a gen *eta* amplikonem o velikosti 425 bp. Amplikon o velikosti 306 bp (P166) slouží k dělení skupiny ETA-B2 na podskupiny ETA-B2a a ETA-B2b a skupiny ETA-B6 na podskupiny ETA-B6a a ETA-B6b (primery byly navrženy již dříve na pracovišti LMDM, Brno)

4.5. PCR genotypizace

V genomech fágů ϕ236 a ϕ841 byla dle postupu Holochové *et al.* (2010a) zjišťována přítomnost 12 genů reprezentujících specifické sekvence fágových modulů. Lokalizaci genů a jejich produkty shrnuje tabulka 27.

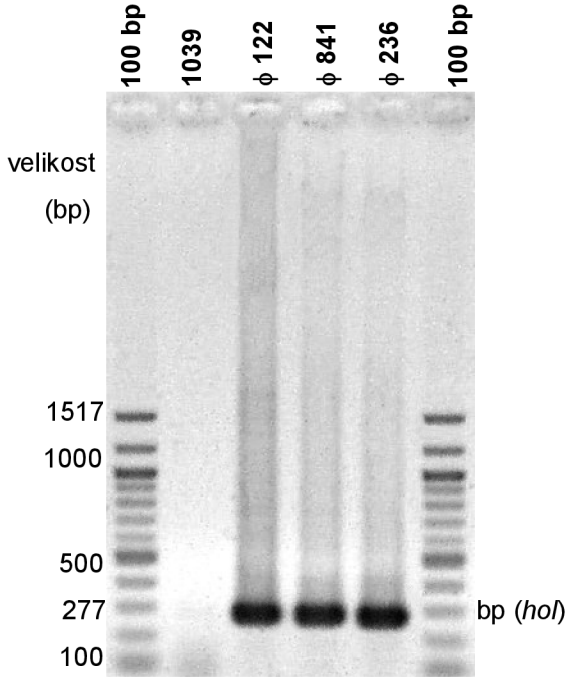
Tabulka 27: Charakterizace genů detekovaných pomocí PCR u studovaných fágů

Lokalizace v modulu pro:	Gen/ORF	Produkt/funkce
lyzogenii	*int*	integráza
	int-orf	integráza + neznámá funkce
	xis	excizionáza
replikaci DNA	*orf13-15* (polymorfní segment - P2)	produkty se účastní replikace fágové DNA
sbalování DNA	*terL*	velká podjednotka terminázy
	por	portálový protein
proteiny hlavy	*orf42-44* (konzervativní segment - C4)	produkty tvořící fágový kapsid
vlákna bičíku	*orf57-58*	strukturní proteiny
	orf62-63	proteiny vláken bičíku
lyzi	*hol*	holin
	ami	amidáza
	eta	exfoliativní toxin A

Dále byla zjišťována přítomnost sekvencí R234 (modul pro regulaci transkripce, produktem je imunitní receptor) a P166 (modul pro replikaci DNA, produkt s neznámou funkcí). K detekci těchto sekvencí byly použity primery, které byly již dříve navrženy na pracovišti LMDM. Detekována byla i sekvence ETA2-18 (modul pro proteiny hlavy, produktem je portálový protein) s použitím primerů navržených v této práci.

Elektroforetogram PCR detekce genu *hol* u vybraných fágů je na obrázku 15, ostatní geny byly detekovány obdobně. Přítomnost genů a vybraných sekvencí u studovaných fágů a jejich srovnání se sekvencemi dalších fágů zařazených do jednotlivých ETA-B skupin znázorňuje tabulka 28 a obrázek 16. Genotypizace fágů ϕETA, ϕETA2 a ϕETA3 (jejich kompletní genomové sekvence jsou v databázi GenBank) byla provedena *in silico*; fág ϕ234 byl na pracovišti LMDM podroben PCR genotypizaci již dříve.

Obrázek 15: Elektroforetogram PCR detekce genu *hol*



Kmen 1039: negativní kontrola **DNA ϕ122**: pozitivní kontrola

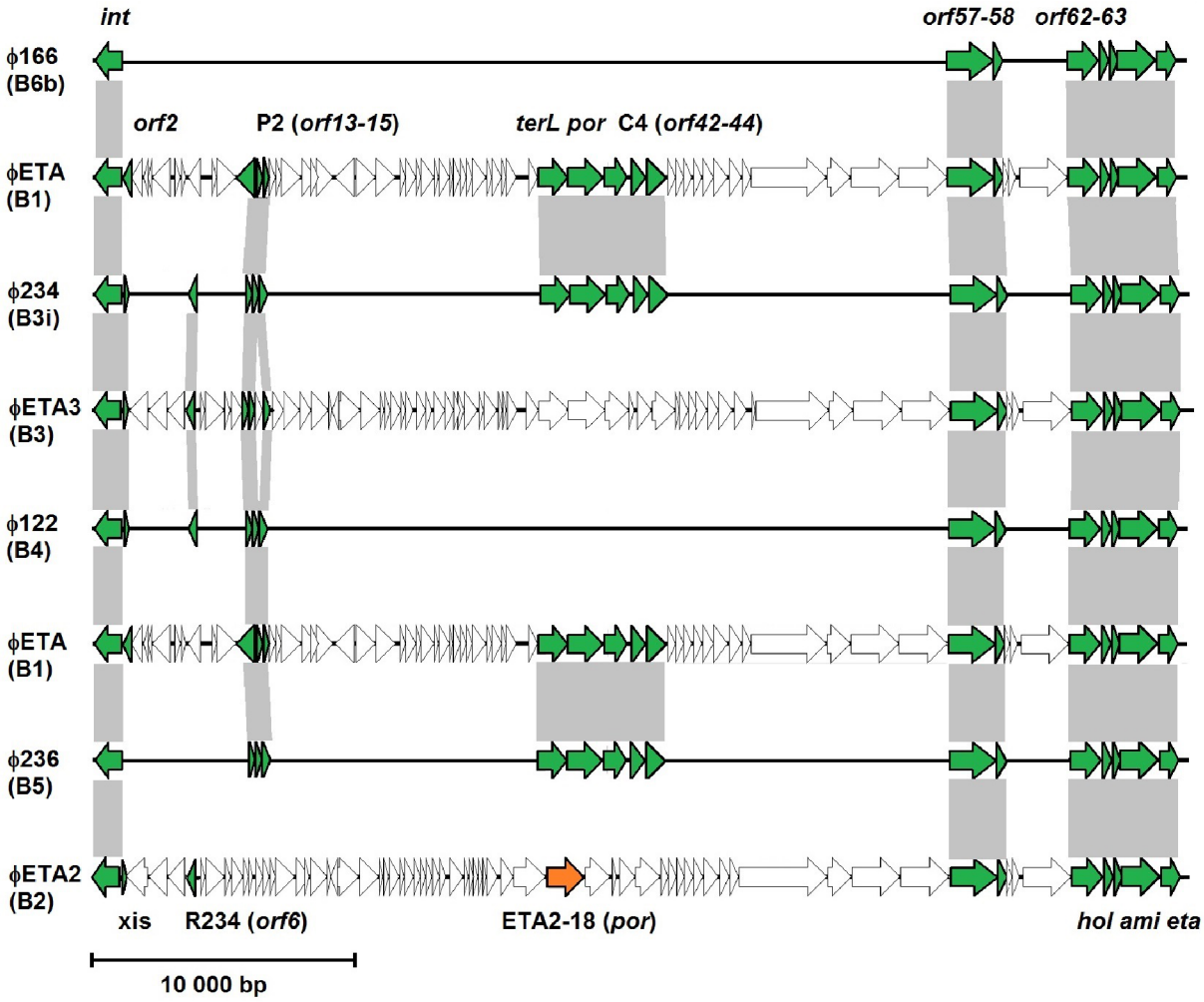
Tabulka 28: Genotypizace a srovnání vybraných *eta*-fágů

MODUL	GEN/ORF/ SEKVENCE	Vybrané *eta*-pozitivní fágy							
		ϕETA (B1)	ϕETA2 (B2)	ϕ841 (B2)	ϕETA3 (B3)	ϕ234 (B3i)	ϕ122 (B4)	ϕ236 (B5)	ϕ166 (B6b)
LYZOGENIE	*int*	+	+	+	+	+	+	+	+
	int-orf2	+	-	-	-	-	-	-	-
	xis	-	+	+	+	+	+	-	-
REPLIKACE DNA	*orf13-15 (P2)*	+	-	-	+ [a]	+ [b]	+	+	-
	P166	-	-	-	-	-	-	-	+
TRANSKRIPCE	R234	-	+	+	+	+	+	-	-
SBALOVÁNÍ DNA	*terL*	+	-	-	-	+	-	+	-
	por	+	-	-	-	+	-	+	-
PROTEINY HLAVY	*orf42-44 (C4)*	+	-	-	-	+	-	+	-
	ETA2-18	-	+	+	-	-	-	-	-
VLAKNA BIČÍKU	*orf57-58*	+	+	+	+	+	+	+	+
	orf62-63	+	+	+	+	+	+	+	+
LYZE	*hol*	+	+	+	+	+	+	+	+
	ami	+	+	+	+	+	+	+	+
	eta	+	+	+	+	+	+	+	+

[a] velikost amplikonu je 932 bp (prototypová velikost je 625 bp)

[b] amplikon obsahuje inzert o velikosti 325 bp

Obrázek 16: Lokalizace detekovaných genů/sekvencí v genomech vybraných fágů



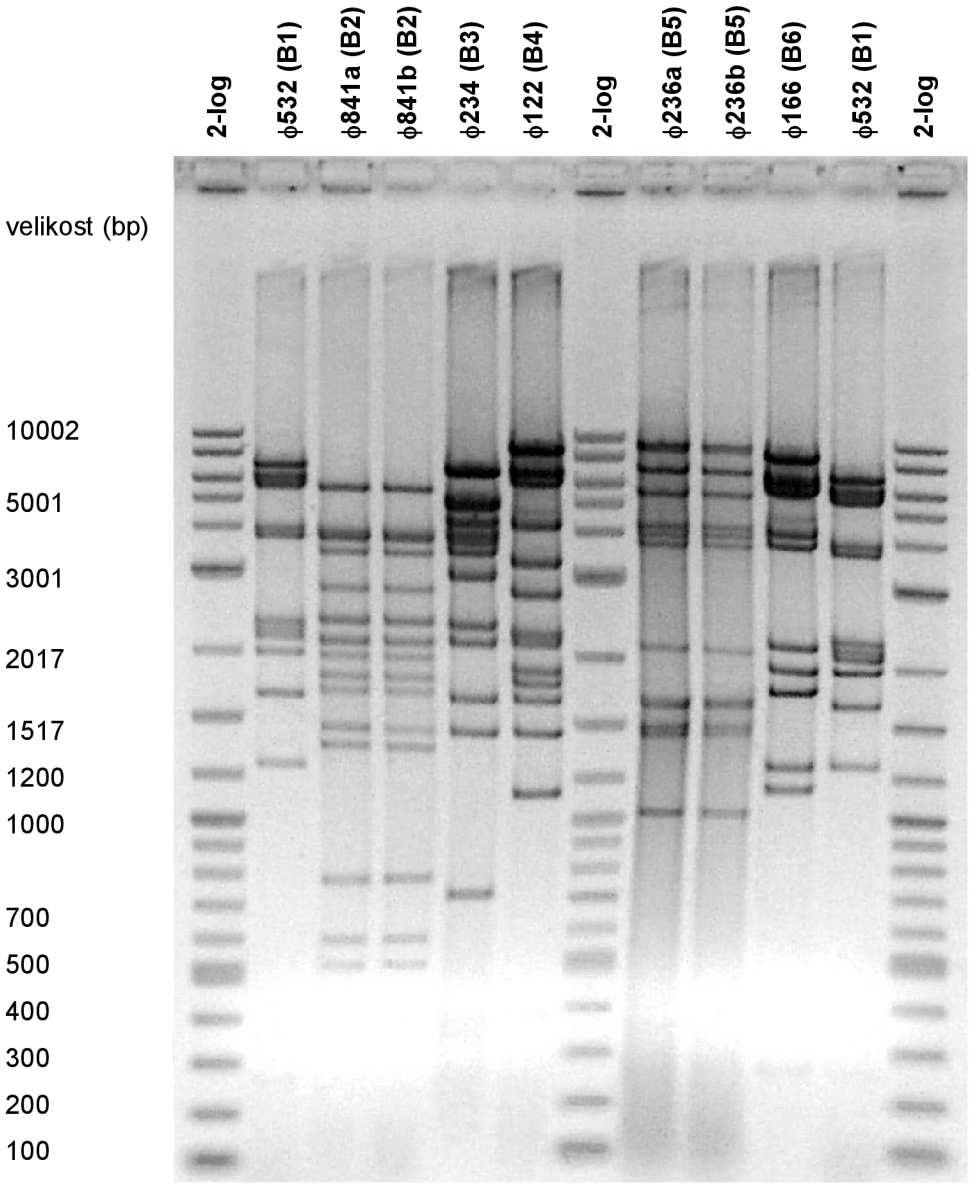
Identifikované otevřené čtecí rámce sekvenovaných fágů ϕETA, ϕETA2 a ϕETA3 jsou vyznačeny šipkami, jejichž orientace značí směr transkripce. Zeleně a oranžově jsou vyznačeny geny/*orf*, které byly identifikovány pomocí PCR genotypizace. Pozice genů/*orf* v genomech nesekvenovaných fágů jsou určeny na základě modulárního uspořádání. Shody v přítomnosti hledaných sekvencí jsou znázorněny šedými spojnicemi. Oranžově je označen gen pro portálový protein fága ϕETA2, který byl detekován nově navrženými primery ETA2-18 (detekce s primery por byla negativní), přičemž gen *por* ostatních fágů byl detekován primery por (zatímco detekce s primery ETA2-18 byla negativní). Výsledky genotypizace fága ϕ841 jsou shodné s *in silico* typizací fága ϕETA2.

Genotypizace potvrdila zařazení fága ϕ841 do skupiny ETA-B2. U fága ϕ236 byl nově stanoven genotypový profil ETA-B5 fágů.

4.6. Analýza *Hin*dIII restrikčního spektra fágů ϕ236 a ϕ841

Na obrázku 17 je elektroforetogram demonstrující *Hin*dIII restrikční spektra DNA bakteriofágů ϕ236 a ϕ841 ve srovnání s fágy ostatních ETA-B skupin, izolovaných v LMDM již dříve. Podle vzoru restrikčních profilů je zřejmé, že fágy ϕ236 a ϕ841 se mezi sebou i ve srovnání s ostatními *eta*-pozitivními fágy výrazně liší. Některé fragmenty jsou společné více fágům, příkladem je dvojitý fragment o velikosti přibližně 3800 bp, zjištěný u fágů ϕ532, ϕ841 a ϕ234. Fág ϕ532 má s ϕ841 společný také fragment o velikosti asi 5400 bp a s fágem ϕ236 fragment o velikosti zhruba 6900 bp. Genomy všech porovnávaných fágů, s výjimkou ϕ166, mají společný fragment o velikosti asi 2100 bp.

Obrázek 17: *Hin*dIII restrikční spektra genomu fágů různých ETA-B skupin



Pomocí programu ANAGEL 1.2 (Mrázek a Španová, 1992) byla z několika elektroforetogramů odhadnuta velikost jednotlivých fragmentů *Hin*dIII restrikčního spektra i celková velikost genomu fágů ϕ841 a ϕ236. Výsledky měření jsou uvedeny v tabulce 29.

Tabulka 29: Stanovení velikosti *Hin*dIII restrikčních fragmentů a genomu fágů ϕ841 a ϕ236

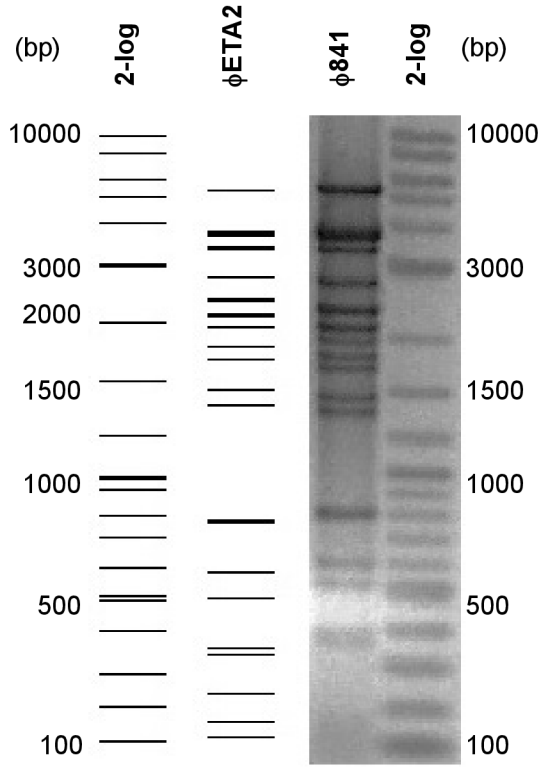
Velikost restrikčního fragmentu (bp)	ϕ841	ϕ236
1.	5400	9100
2.	3800	6900
3.	3700	5650
4.	3350	4250
5.	2700	4000
6.	2300	3700
7.	2100	2100
8.	2000	1600
9.	1800	1500
10.	1700	1450
11.	1450	1000
12.	1350	400
13.	800	250
14.	600	
15.	500	
16.	350	
17.	250	
Celkový počet fragmentů	**21**	**14**
Celková velikost genomu (kb)	**42,7**	**43,5**

: pravděpodobně dvojitý fragment

Bylo zjištěno, že *Hin*dIII restrikční spektrum genomu fága ϕ236 je jedinečné a je tvořeno 14 fragmenty. Celková velikost genomu ϕ236 je 43,5 kb, což odpovídá velikosti genomu sekvenovaných fágů ϕETA, ϕETA2 a ϕETA3.

*Hin*dIII restrikční spektrum DNA fága ϕ841 se skládá z 21 fragmentů a velikost jeho genomu je přibližně 42,7 kb. Srovnání s *Hin*dIII restrikčním spektrem fága ϕETA2 (štěpen *in silico*) ukazuje, že obě spektra jsou navzájem téměř shodná (obr. 18). Pokud jsou k velikosti genomu fága ϕ841 připočítány i tři nejmenší fragmenty fága ϕETA2, o celkové velikosti 499 bp, pak si oba fágy odpovídají i velikostí genomu.

Obrázek 18: Srovnání *Hin*dIII restrikčního spektra fága ϕETA2 a ϕ841



4.7. Bioinformatická analýza 18. fragmentu *Hin*dIII restrikčního spektra fága ϕETA2

Pro potvrzení shody mezi fágy ϕETA2 a ϕ841 byl pro další analýzu vybrán 18. fragment (582 bp) *Hin*dIII restrikčního spektra fága ϕETA2, který velikostí odpovídá 18. fragmentu fága ϕ841. Tento fragment je v porovnání se spektry fágů ϕ532, ϕ234, ϕ122, ϕ236, ϕ166 (obr. 16) i fágů ϕETA a ϕETA3 (restrikční štěpení *in silico*) jedinečný. Sekvence fragmentu (označena jako ETA2-18) byla lokalizována v genomu ϕETA2 (AP008953) v pozici 18 383 – 18 964 nt (obr. 19). Nalezený otevřený čtecí rámec kóduje protein o velikosti 188 aa.

Sekvence ETA2-18 byla identifikována jako součást genu *orf43* pro portálový protein fága ϕETA2, rodiny SPP1 (fágový modul pro proteiny hlavy). Celková velikost proteinu je 511 aa, přičemž proteinová sekvence kódovaná ETA2-18 se nachází v pozici 154 – 342 aa.

Sekvence genu *orf43* byla programem BLAST srovnána s fágovými sekvencemi v databázi GenBank. Shoda se sekvenovanými *eta*-fágy nebyla nalezena. Naopak 97% shoda se 100% pokrytím byla nalezena u bakteriofága 69 (AY954951) a fága ϕ11 (AF424781).

Obrázek 19: Sekvence ETA2-18 a vyznačení ORF nalezeného programem ORF Finder (NCBI)

```
zastoupení bazí     213 a     79 c    118 g    171 t    G+C 33,9 %

ORF             14..580

        1 agcttatgag ttaatgatta gaaaccaaga tgatgaaacg cgtttataca aaagtgatgc
       61 aatgagtact tttgtcatat acgacaatac aattgaacgt aatagtatcg caggcgttag
      121 atatttaaga actaaaccaa tagacaagac tgacgaagat gaagtgttta cagttgattt
      181 attcacttca cacggtgttt atagatatct taccagtaga acaaatggat tgaagctcac
      241 accacgtgaa aacggttttg aatcacactc tttcgaacgt atgcctatta cagaatttag
      301 caacaacgaa agaagaaaag gggattatga gaaagtaatc actttaattg atttgtatga
      361 taatgctgaa tcagatactg ctaactatat gagtgattta aatgacgcta tgttacttat
      421 taaaggtaat ttaaatttag atcctgtaga agttagaaaa caaaaggaag ctaacgtgtt
      481 gtttttagaa ccgactgttt atgctgatag cgaaggtaga gaaacagaag gctctgttga
      541 tggtggttat atttataagc aatacgatgt acaaggtacc g

souvislá proteinová sekvence:

MIRNQDDETRLYKSDAMSTFVIYDNTIERNSIAGVRYLRTKPIDKTDEDEVFTVDLFTSHGVYRYLTSRTNGLKL
TPRENGFESHSFERMPITEFSNNERRKGDYEKVITLIDLYDNAESDTANYMSDLNDAMLLIKGNLNLDPVEVRKQ
KEANVLFLEPTVYADSEGRETEGSVDGGYIYKQYDVQGT
```

Červeně zvýrazněn je iniciační kodon nalezeného otevřeného čtecího rámce.

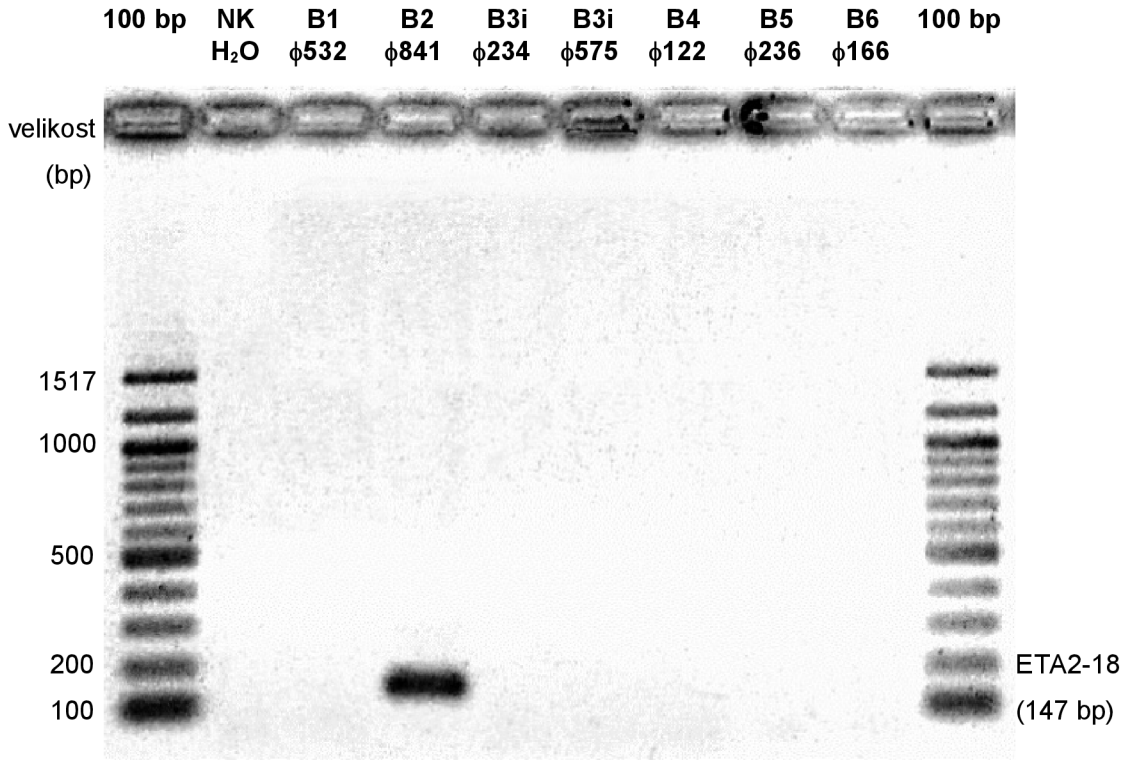
4.8. PCR detekce sekvence ETA2-18

Pro detekci sekvence ETA2-18 u ostatních fágů a kmenů *S. aureus* byly pomocí programu Primer-BLAST (NCBI) navrženy primery (tabulka 30) a dále byl sestaven a optimalizován PCR protokol (tabulka 22, 23 a 24). Nově navrženou PCR byla detekována přítomnost amplikonu u vybraných fágů jednotlivých ETA-B skupin (obr. 20). Amplifikace sekvence ETA2-18 proběhla jen u fága ϕ841.

Následně byla provedena detekce sekvence ETA2-18 u klinických kmenů *S. aureus* patřících do skupiny ETA-B2 (obr. 21). U všech kmenů byl detekován amplikon o velikosti 147 bp. Stejnou PCR byly prověřeny i klinické kmeny *S. aureus*, které podle typu obsaženého *eta*-profága patří do ostatních ETA-B skupin: 98/557 (ETA-B1), 02/018 (ETA-B3i), 07/122 (ETA-B4), 04/058 (ETA-B5), 03/596 (ETA-B6a), 03/599 (ETA-B6a) a 10/109 (ETA-B6b). Ve všech případech byla reakce negativní, nevytvořil se amplikon.

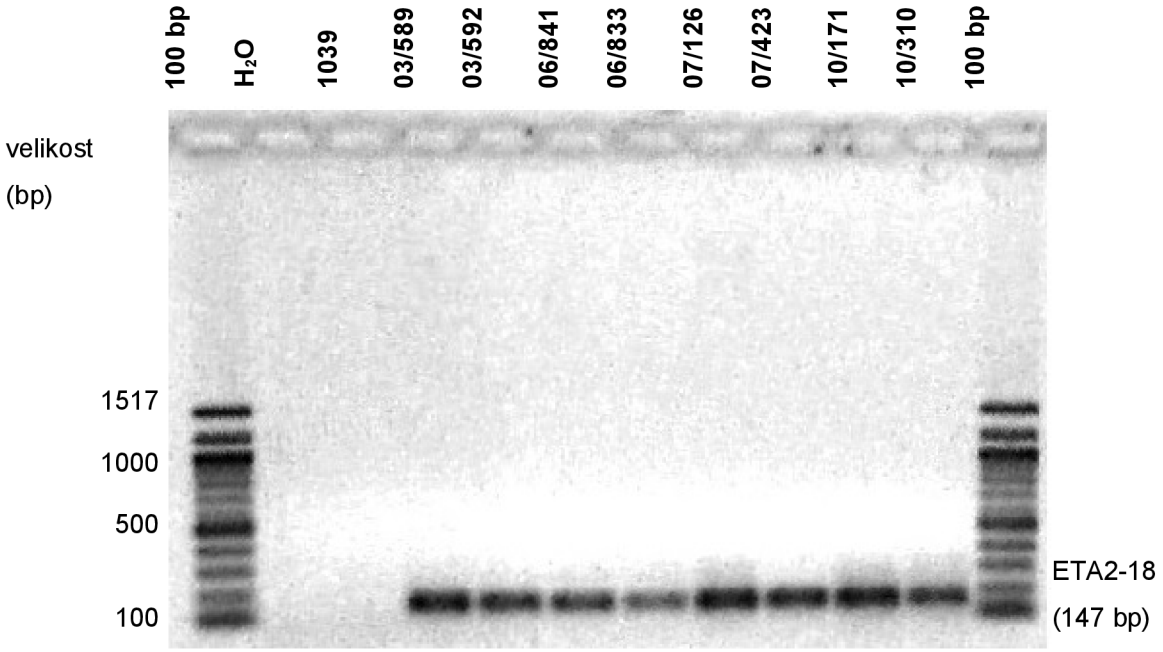
Gen pro portálový protein je u fágů a profágů detekován i pomocí amplikonu SGBa (viz kapitola 4.3.1.). Obrázek 22 zobrazuje srovnání genů pro portálový protein fága ϕETA2 a SAP-26, kdy SGBa amplikon vzniká v obou případech, ETA2-18 amplikon však jen u fága ϕETA2 (*in silico*).

Obrázek 20: PCR detekce sekvence ETA2-18 u fágů různých ETA-B skupin



NK: H_2O - negativní kontrola

Obrázek 21: PCR detekce sekvence ETA2-18 u ETA-B2 klinických kmenů *S. aureus*

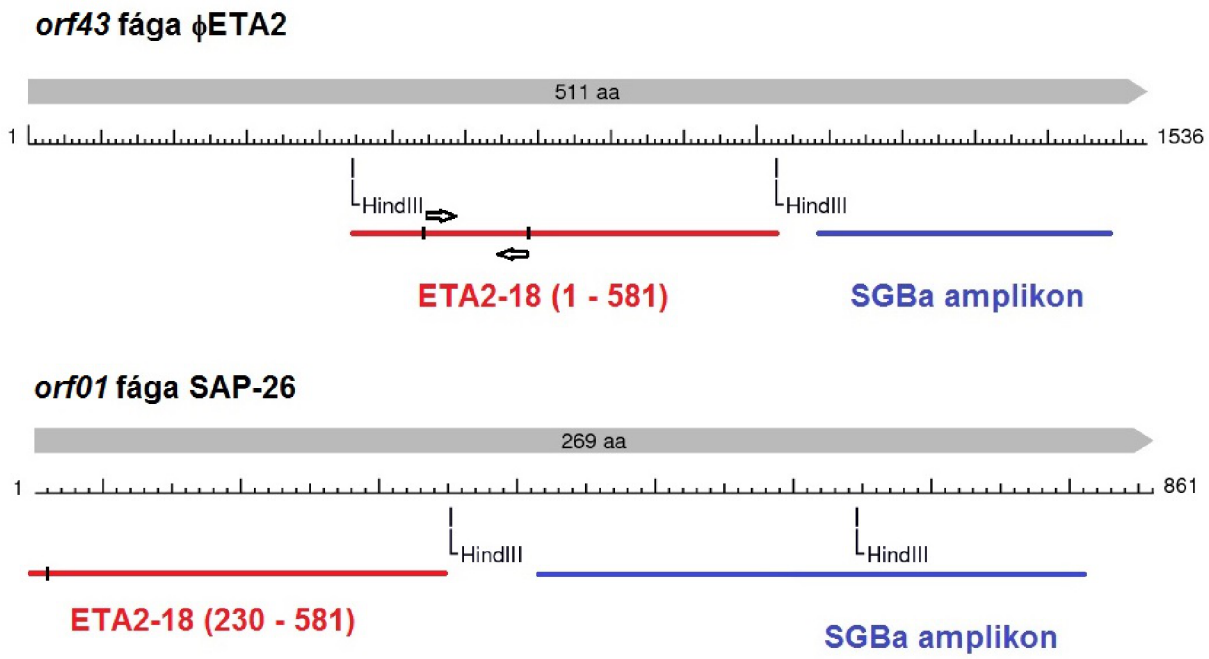


H_2O: negativní kontrola **1039**: negativní kontrola

Tabulka 30: Charakteristika primerů pro PCR detekci sekvence ETA2-18

Primer	Sekvence (5´-3´)	Délka (bp)	Start (nt)	Stop (nt)	Tm (°C)	GC (%)
ETA2-18F	CGTAATAGTATCGCAGGCGT	20	98	117	57,67	50
ETA2-18R	TGGTGTGAGCTTCAATCCAT	20	244	225	57,11	45
Velikost produktu					147 bp	

Obrázek 22: Srovnání genu pro portálový protein fága ϕETA2 a *eta*-negativního fága SAP-26



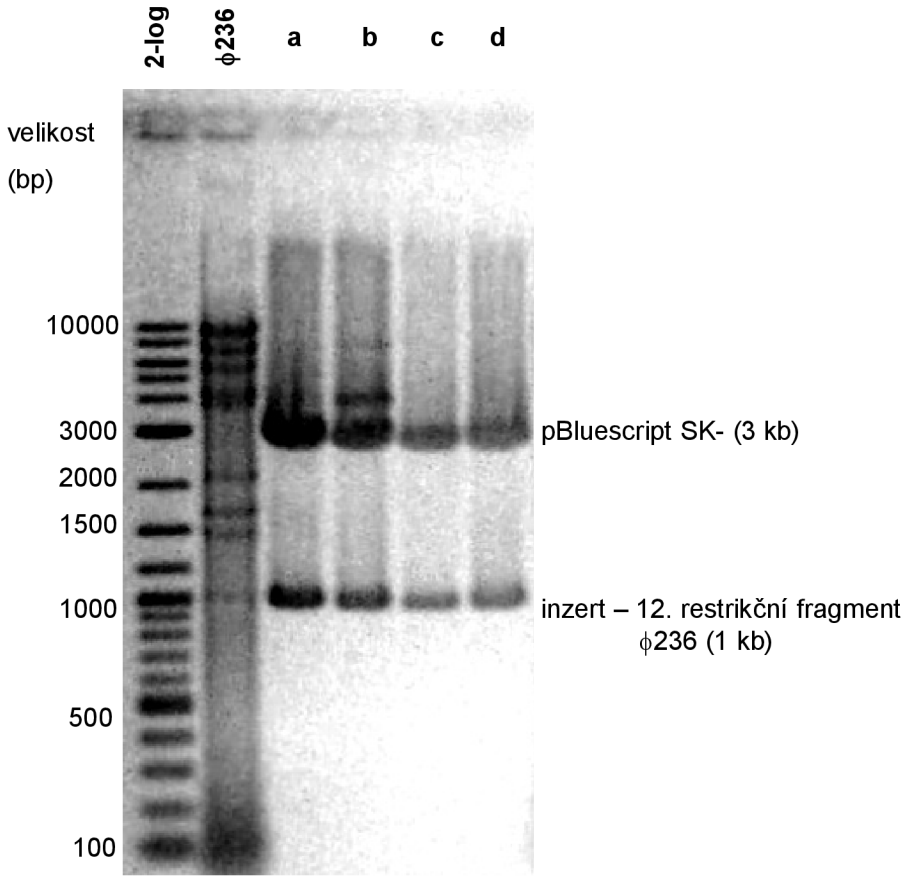
Pozn.: černé značky se šipkami ohraničují lokalizaci 147bp amplikonu ETA2-18
Sekvenční shoda mezi amplikony SGBa (400 bp) obou fágů je 94%. Jednou ze sekvenčních změn u fága SAP-26 došlo k vytvoření dalšího *Hin*dIII restrikčního místa.

4.9. Klonování vybraného fragmentu *Hin*dIII restrikčního spektra ϕ236

Na základě srovnání vzorů *Hin*dIII restrikčních spekter DNA fágů jednotlivých ETA-B skupin byl pro další analýzu vybrán jedinečný 12. fragment fága ϕ236 o velikosti 1000 – 1040 bp. Tento fragment byl následně klonován do vektoru pBluescript SK-.

Celkem byly izolovány 4 vzorky rekombinantní DNA (po 50 µl). Pro následnou sekvenaci byl vybrán vzorek C. Výsledek klonování je znázorněn elektroforetogramem na obrázku 23. Izolované vzorky byly analyzovány na základě štěpení *Hin*dIII restriktázou.

Obrázek 23: Klonování 12. restrikčního fragmentu fága ϕ236



ϕ236: pozitivní kontrola přítomnosti fragmentu **a, b, c, d**: vzorky izolované rekombinantní DNA

koncentrace vzorků: a – 480 ng/μl b – 500 ng/μl c – 350 ng/μl d – 410 ng/μl

4.9.1. Bioinformatická analýza 12. restrikčního fragmentu ϕ236

Rekombinantní DNA byla purifikována a odeslána na sekvenaci. Na základě překryvů sekvencí a po odstranění částí vektorové sekvence byla sestavena sekvence R236 o délce 1001 nt (obr.24). Obsah G + C v sekvenci R236 je 32,6 % a blíží se tak celkovému obsahu G + C v genomu sekvenovaných *eta*-fágů. Pomocí programu ORF Finder (NCBI) byly v sekvenci R236 identifikovány dva otevřené čtecí rámce a odpovídající proteinové sekvence (obr. 25).

Obrázek 24: Sekvence 12. fragmentu *Hin*dIII restrikčního spektra ϕ236 (sekvence R236)

```
1001 bp    DNA     linear     385 a   151 c   175 g   290 t
  1  AGCTTCAAAT TAGACAAGTC GCTGAAATAT TTGCGACATG AGAGGGTGCA TCTGCGCTCT
 61  CTCTTTTTTT ATACAATTTT CACGGGTAGC CCGCCTACCC TTATTATTTT TTGCCAATTT
121  TGAGGAAGGA GAAGTAAAAT GCCAGTATAT AAGGATGATA ATACAGGTAA ATGGTATTTT
181  TCCATTAGAT ATAAAGATGT ATACGGTAAT AACAAACGTA AGATGCAACG CGGTTTTTCA
241  ACTAAGCGTG AAGCTAAGAG TGCAGAGGCT ATTTTTTTGA ATGATGTAAA CGAAGGATAT
301  AGCGATTCAA AAACATTTGA TTATGTTTTT CATCACTATT TAGAAAATAG CGATTTGAGA
361  CCTAAAACAA AACGACGCAA ACAAAATGAA TATCATAAAC ACTTTAAAGC TAAGTTCGGG
421  CACATAAAAA TGAATAAGAT AACGCAAAAT CAATGCCAAG AGTTTCGTAA ATATCTAATA
481  GAGAATGTAG CATCAACAAA TTCCGCTCGT ACAATTTGGT CAGGTTTTAA AGTTGTAATT
541  AATTATGCCA AAAAATATTT TGGATTACGT ACAGATCCAA CAATATCAAT TAAACCTATT
601  CCGCGTGTAA AACCAAAACC TAAGTTTATG ATGCGTGAAG AATTTGAAGA AAGAATCAAA
661  GACATTGAAG AGCAAGATTA CAGAGAGTTA TTTACATTAA TGTTTTATAC AGGTTTGAGG
721  ATTGGCGAAG CTATGGCGCT TGTTTGGACA GACTACAATA AATACAAAAA AGAGATATCC
781  ATAAATAAAA CAATGGACAT CTCTAATAGA ACTATATATC CGAGACCAAA AACAGATAGT
841  TCAGAGGATA TTGTTCCTTT ACCTAAATTC ATCAATACAA TGTTAACTGA ACGACATCAA
901  CGTGAAAAAG AGTTAAACAA ATATTTTGAT GAACGTAGTT ATTTTATTTT CGGAGGAATG
961  GCTCCCAAAC ATTACAGTCA TGTTCAAAAG AAATTTCAAA A
```

Zeleně je znázorněn terminační kodon otevřeného čtecího rámce v pozici 1 – 123 nt, červeně je znázorněn iniciační kodon otevřeného čtecího rámce v pozici 139 – 999 nt.

Obrázek 25: Otevřené čtecí rámce v sekvenci R236 a odpovídající souvislé proteinové sekvence

```
>lcl|Sequence 1 ORF:139..999 Frame +1
ATGCCAGTATATAAGGATGATAATACAGGTAAATGGTATTTTTCCATTAGATATAAAGATGTATACGGTA
ATAACAAACGTAAGATGCAACGCGGTTTTTCAACTAAGCGTGAAGCTAAGAGTGCAGAGGCTATTTTTTT
GAATGATGTAAACGAAGGATATAGCGATTCAAAAACATTTGATTATGTTTTTCATCACTATTTAGAAAAT
AGCGATTTGAGACCTAAAACAAAACGACGCAAACAAAATGAATATCATAAACACTTTAAAGCTAAGTTCG
GGCACATAAAAATGAATAAGATAACGCAAAATCAATGCCAAGAGTTTCGTAAATATCTAATAGAGAATGT
AGCATCAACAAATTCCGCTCGTACAATTTGGTCAGGTTTTAAAGTTGTAATTAATTATGCCAAAAAATAT
TTTGGATTACGTACAGATCCAACAATATCAATTAAACCTATTCCGCGTGTAAAACCAAAACCTAAGTTTA
TGATGCGTGAAGAATTTGAAGAAAGAATCAAAGACATTGAAGAGCAAGATTACAGAGAGTTATTTACATT
AATGTTTTATACAGGTTTGAGGATTGGCGAAGCTATGGCGCTTGTTTGGACAGACTACAATAAATACAAA
AAAGAGATATCCATAAATAAAACAATGGACATCTCTAATAGAACTATATATCCGAGACCAAAAACAGATA
GTTCAGAGGATATTGTTCCTTTACCTAAATTCATCAATACAATGTTAACTGAACGACATCAACGTGAAAA
AGAGTTAAACAAATATTTTGATGAACGTAGTTATTTTATTTTCGGAGGAATGGCTCCCAAACATTACAGT
CATGTTCAAAAGAAATTTCAA

>lcl|Sequence 2 ORF:1..123 Frame +1
AGCTTCAAATTAGACAAGTCGCTGAAATATTTGCGACATGAGAGGGTGCATCTGCGCTCTCTCTTTTTTT
ATACAATTTTCACGGGTAGCCCGCCTACCCTTATTATTTTTTGCCAATTTTGA
```

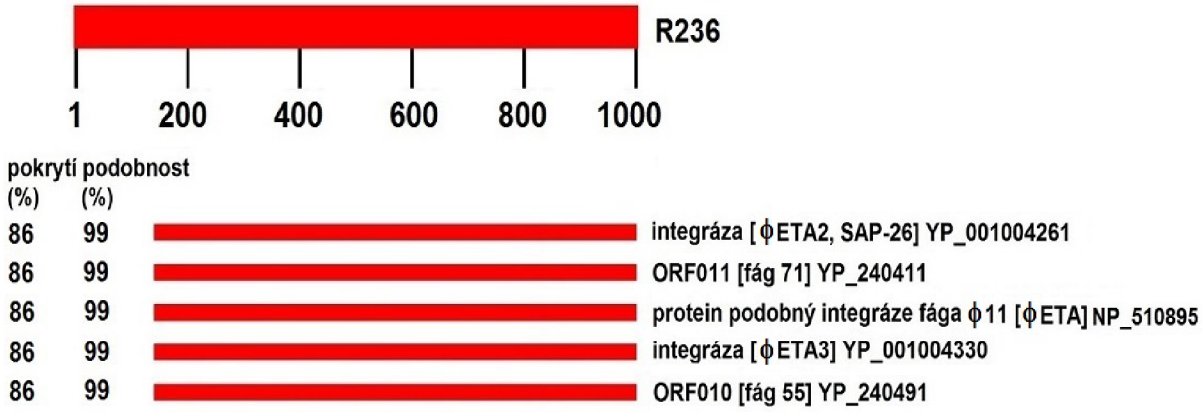
Proteinové sekvence:

```
>lcl|Sequence 1 ORF:139..999 Frame +1
MPVYKDDNTGKWYFSIRYKDVYGNNKRKMQRGFSTKREAKSAEAIFLNDVNEGYSDSKTFDYVFHHYLEN
SDLRPKTKRRKQNEYHKHFKAKFGHIKMNKITQNQCQEFRKYLIENVASTNSARTIWSGFKVVINYAKKY
FGLRTDPTISIKPIPRVKPKPKFMMREEFEERIKDIEEQDYRELFTLMFYTGLRIGEAMALVWTDYNKYK
KEISINKTMDISNRTIYPRPKTDSSEDIVPLPKFINTMLTERHQREKELNKYFDERSYFIFGGMAPKHYS
HVQKKFQ

>lcl|Sequence 2 ORF:1..123 Frame +1
-FKLDKSLKYLRHERVHLRSLFFYTIFTGSPPTLIIFCQF*
```

Sekvence R236 byla porovnána s fágovými proteiny databáze GenBank programem BLASTX (NCBI). Bylo zjištěno, že ORF v pozici 139 – 999 nt sekvence R236 odpovídá části genu pro integrázu *eta*-pozitivních fágů ϕETA, ϕETA2 a ϕETA3, a dále *eta*-negativních fágů 55, 71 a SAP-26 (obr. 26).

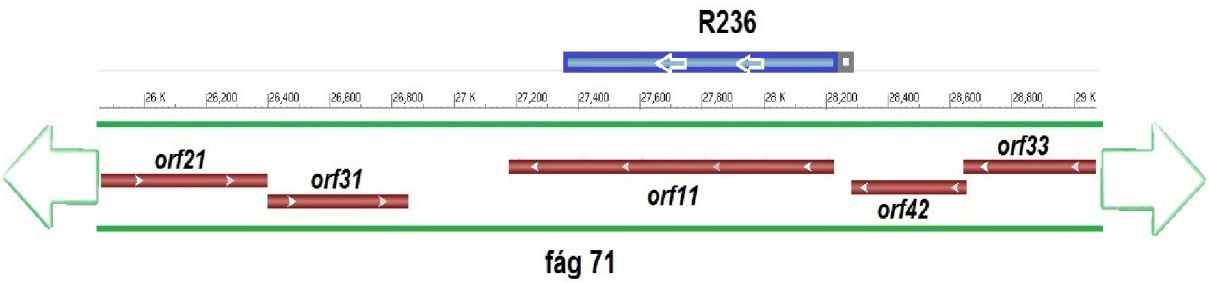
Obrázek 26: Porovnání sekvence R236 s fágovými proteiny programem BLASTX



Pozn.: velikost integrázy je 349 aa, pozice shody je 1 – 287 aa

Nukleotidová sekvence R236 byla dále srovnána s genomy fágů a kmenů *S. aureus* v databázi GenBank pomocí programu BLAST (NCBI). Byla nalezena významná shoda s *eta*-pozitivními fágy ϕETA, ϕETA2 a ϕETA3, a také s *eta*-negativními fágy 55, 71 a SAP-26. Shoda byla nalezena také s profágovými sekvencemi některých *eta*-negativních kmenů *S. aureus*. Výsledek shrnuje tabulka 31. Lokalizaci genu pro integrázu a jeho části odpovídající sekvenci R236 v genomu fága 71 znázorňuje obrázek 27.

Obrázek 27: Porovnání pozice sekvence R236 k odpovídající části genomu fága 71



Pozn.: *orf11* kóduje integrázu

Modře je znázorněna část sekvence R236 homologní k *orf11*, šipky značí směr transkripce. Šedě je označena část sekvence R236, která nevykazuje shodu se sekvencí fága 71.

Tabulka 31: Porovnání sekvence R236 s nukleotidovými sekvencemi fágů a kmenů *S. aureus*

Fág	Databázový kód	Pozice shody	Pokrytí (%)	Shoda (%)
ϕETA	AP001553	240 – 1 158	91	99
ϕETA2	AP008953	240 – 1 161	92	98
ϕETA3	AP008954	240 – 1 158	91	98
fág 55	AY954963	27 369 – 28 288	91	98
fág 71	AY954962	27 354 – 28 272	91	98
fág SAP-26	GU477322	25 274 – 26 193	91	98
Kmen *S. aureus* (profág)				
LGA251 (ϕSaLGA251)	FR821779	873 526 – 874 444	91	99
Mu3 (ϕMu3B)	AP009324	919 139 – 920 057	92	99
Mu50 (ϕMu50B)	BA000017	917 694 – 918 612	92	99
04-02981 (ϕSaST5K)	CP001844	876 396 – 877 315	91	98
JH1 (ϕSa1JH1)	CP000736	920 625 – 921 544	93	98
JH9 (ϕSa1JH9)	CP000703	920 750 – 921 669	93	98
ED98 (ϕAv1)	CP001781	853 867 – 854 787	93	98
RF122 (ϕPV83)	AJ938182	848 320 – 848 729	50	99

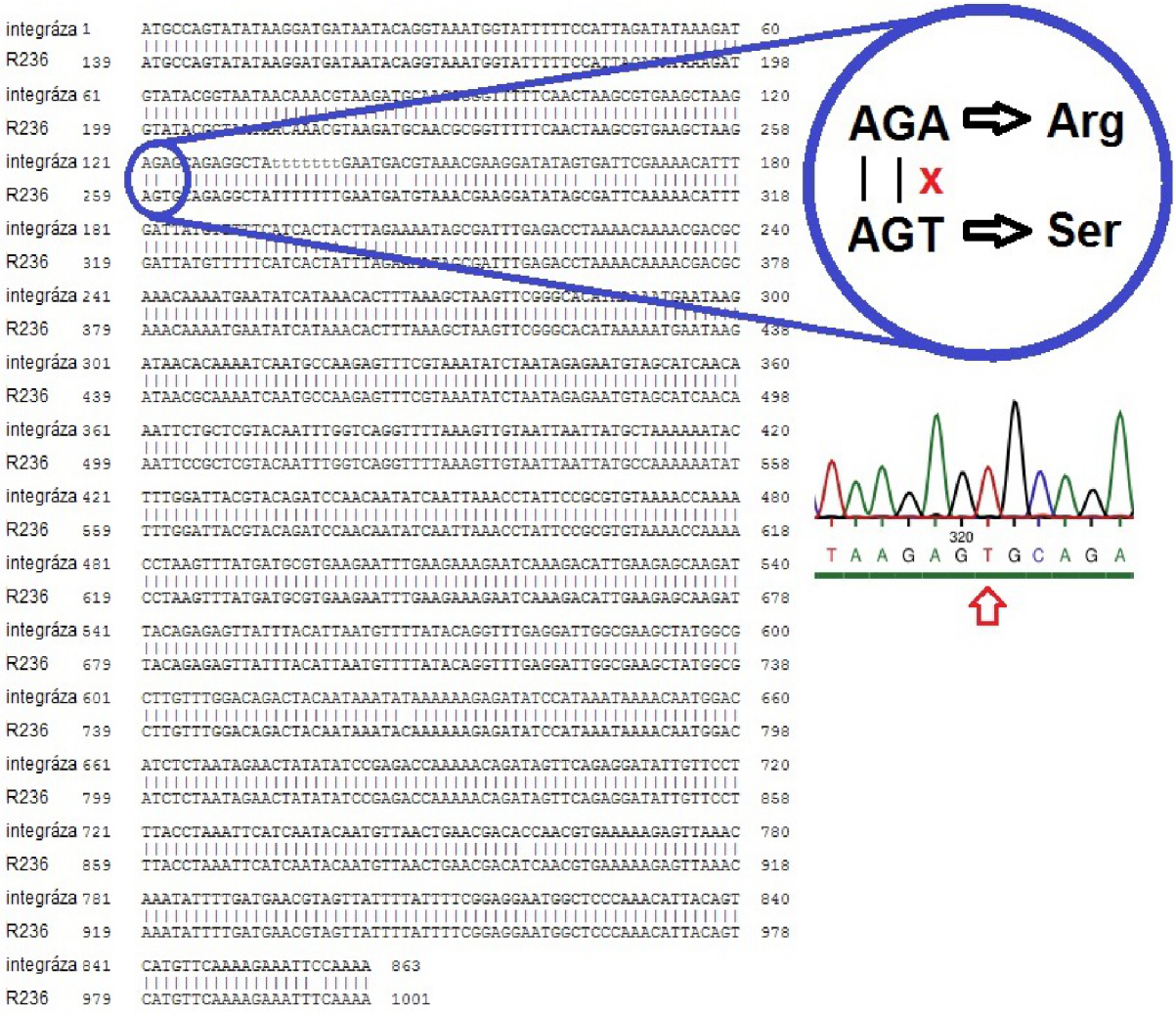
eta-pozitivní fágy Pozn.: zahrnuty jen výsledky s pokrytím nad 50 %

PCR integrázovou typizací pomocí primerů navržených Goerke *et al.* (2009), provedenou *in silico* u srovnávaných fágů a profágů bylo zjištěno, že všechny testované fágy i profágy *eta*-negativních kmenů *S. aureus* (uvedených v tab. 31) mají, stejně jako fág ϕ236, integrázu typu Sa1. Výjimkou je profág ϕPV83 s integrázovým typem Sa5. Amplikon Sa1int vznikal i při PCR *in silico* sekvence R236.

Analýzou párového přiložení sekvence R236 a sekvence genu pro integrázu fága ϕETA2 bylo zjištěno, že v sekvenci R236 došlo k transverzní substituci, která měla za následek záměnu argininu v aminokyselinovém řetězci integrázy v pozici 41 za serin (obr. 28). Všechny ostatní srovnávané fágové sekvence genu pro integrázu obsahují v pozici 41 arginin.

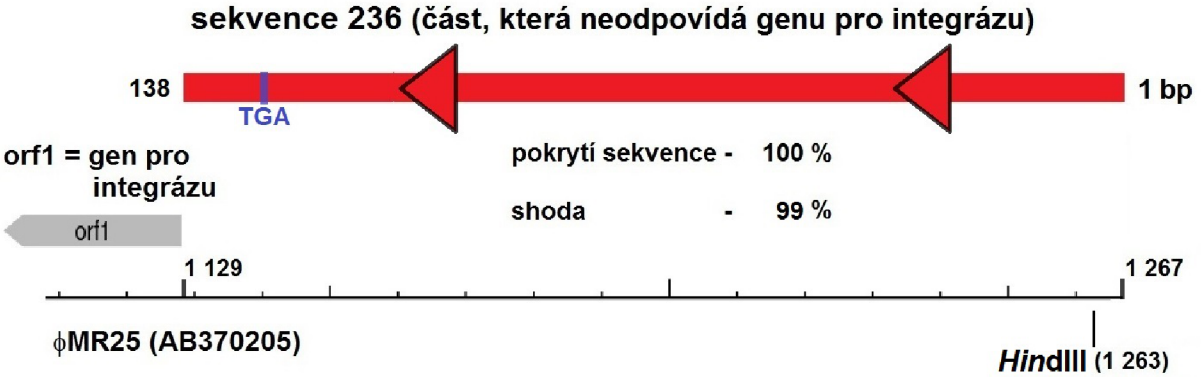
Pomocí programu BLAST byla dále srovnávána část sekvence R236, která neodpovídá genu pro integrázu. Tato část sekvence o velikosti 138 nt zahrnuje ORF v pozici 1 – 123 nt. Bylo zjištěno, že sekvence odpovídá části sekvence genomu fága ϕMR25 s neznámou funkcí (obr. 29). Shoda v nukleotidových sekvencích byla nalezena i s fágy 92 (AY954967) a 85 (AY954953) - pokrytí 94 %, shoda 99 %, resp. 98 %. Celkové složení sekvence R236 je uvedeno na obrázku 30.

Obrázek 28: Lokální párové přiložení sekvence genu pro integrázu fága ϕETA2 a sekvence R236



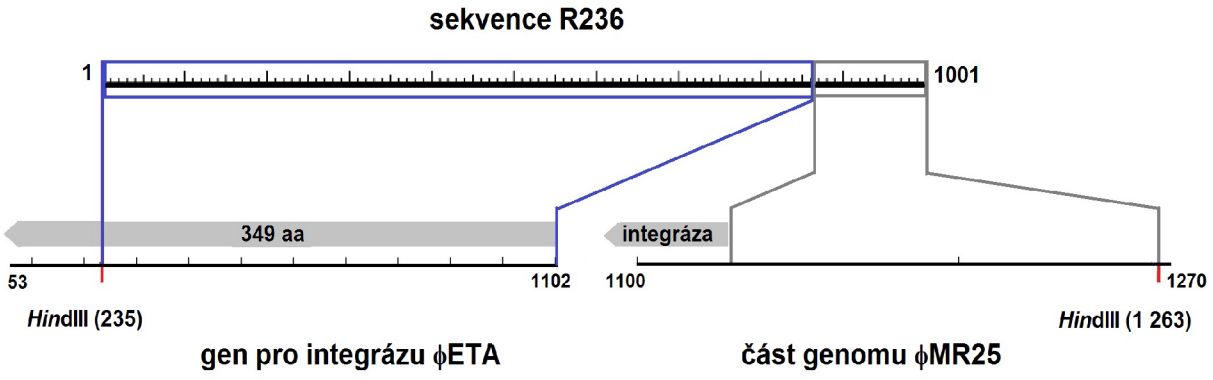
Modře je zvýrazněno místo transverze. Zobrazena je i část výstupu sekvenace substituované oblasti. Dobrá kvalita sekvenace značí, že se nejedná o chybu.

Obrázek 29: Srovnání části R236, která neodpovídá genu pro integrázu, se sekvencí fága ϕMR25



Šipky značí směr transkripce, modře je vyznačen terminační kodon ORF nalezeného v sekvenci R236 v pozici 1 – 123. V sekvenci fága ϕMR25 je vyznačeno místo štěpení restriktázou *Hin*dIII, které odpovídá začátku sekvence R236.

Obrázek 30: Celkové složení sekvence R236



Modře je znázorněna část odpovídající genu pro integrázu a šedě úsek odpovídající části genomu fága ϕMR25. Zároveň jsou vyznačeny hranice sekvence R236, vymezené *Hin*dIII restrikčními místy, která jsou přítomna i v sekvencích srovnávaných fágů ϕETA a ϕMR25.

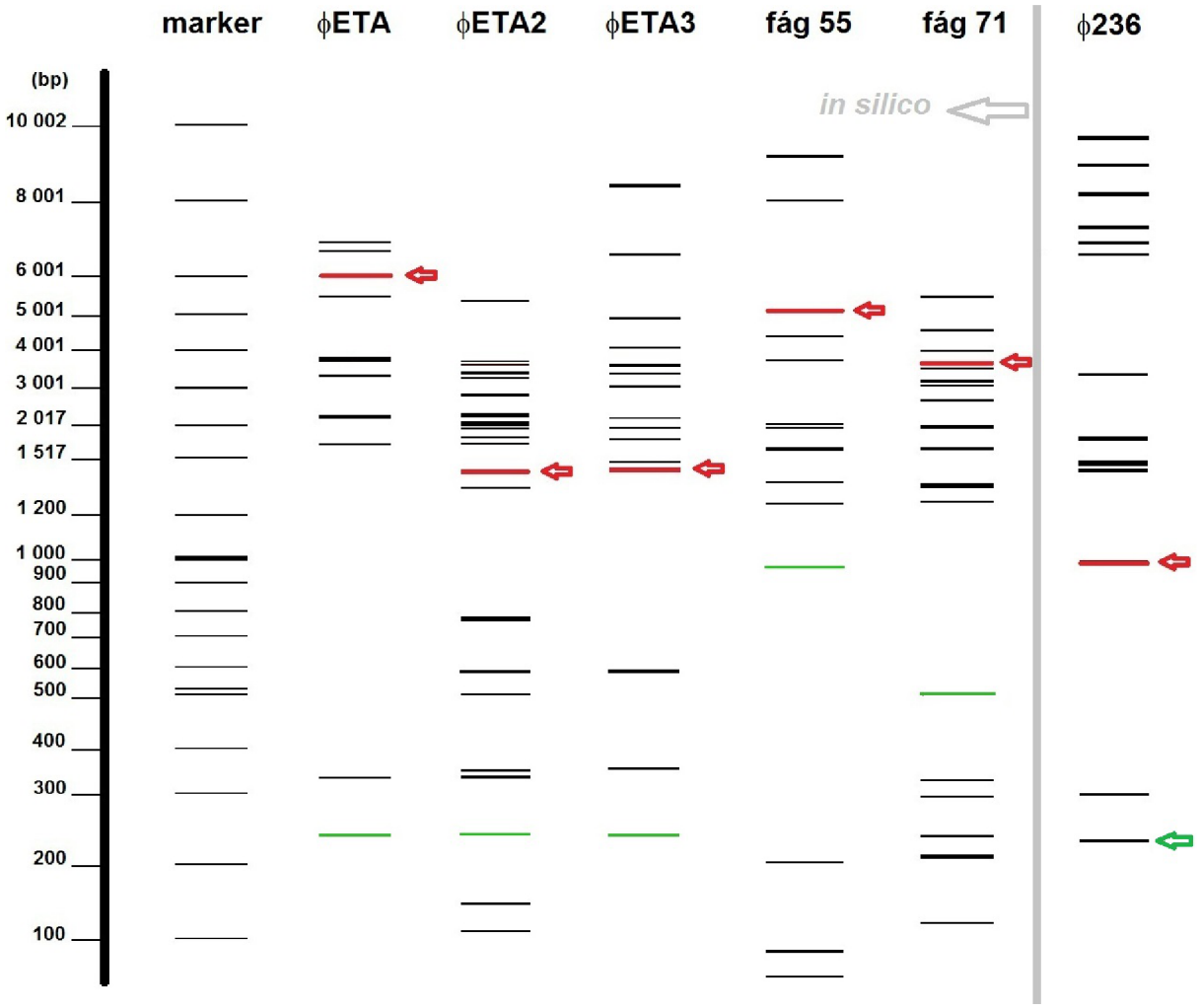
4.9.2. Lokalizace genu pro integrázu v *Hin*dIII restrikčním spektru fágů

Gen pro integrázu byl u vybraných bakteriofágů lokalizován v různých fragmentech *Hin*dIII restrikčního spektra, jak znázorňuje tabulka 32 a *in silico* analýza na obrázku 31.

Tabulka 32: Lokalizace genu pro integrázu

	Velikost fragmentu s částí genu pro integrázu:	
Fág	**odpovídající sekvenci R236 (bp)**	**mimo sekvenci R236 (bp)**
ϕETA	6 077	235
ϕETA2	1 449	235
ϕETA3	1 448	235
fág 55	5 175	983
fág 74	3 838	513
ϕ236	1 001	-

Obrázek 31: Srovnání *Hin*dIII restrikčního spektra a lokalizace genu pro integrázu vybraných fágů

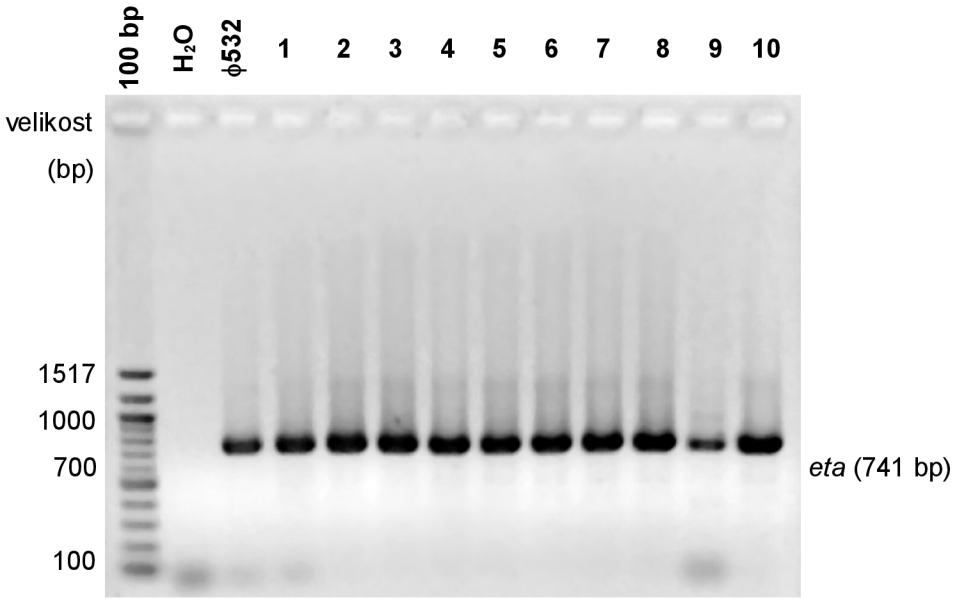


Červeně zvýrazněný fragment se šipkou nese část genu pro integrázu, která je homologní se sekvencí R236 fága ϕ236. Zeleně je zvýrazněn fragment se zbylou částí sekvence genu pro integrázu. Zelenou šipkou je zvýrazněna možná pozice části integrázového genu v restrikčním spektru fága ϕ236.

4.10. Lyzogenizace netoxinogenního kmene *S. aureus* fágem ϕ236 a ϕ841

Schopnost horizontálního přenosu genu *eta* a pozitivní lyzogenní konverze byla ověřena lyzogenizací bezprofágového a netoxinogenního kmene *S. aureus* 1039 oběma fágy, ϕ236 i ϕ841. Přítomnost profágové DNA v koloniích lyzogenů, vybraných na základě pozitivního testu rezistence k fágové superinfekci, byla ověřena PCR detekcí bičíkových genů a genu *eta*. Jak vyplývá z obrázku 32, všechny izoláty byly *eta*-pozitivní.

Obrázek 32: PCR detekce genu *eta* u kolonií *S. aureus* 1039 podrobených lyzogenizaci



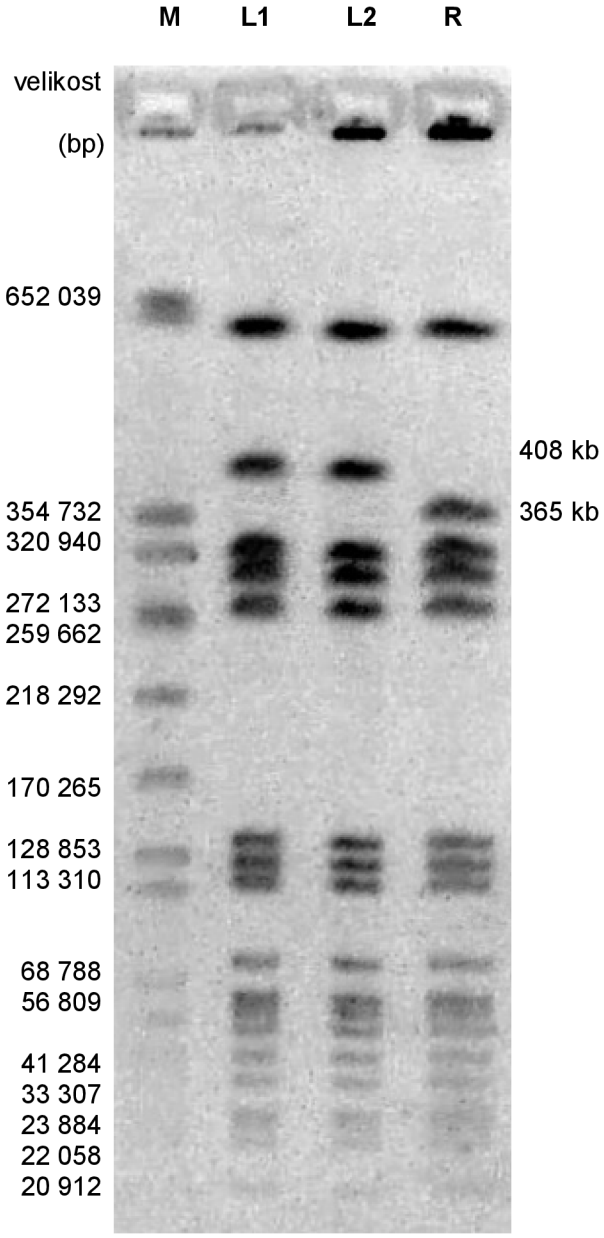
H_2O: negativní kontrola **ϕ532**: pozitivní kontrola přítomnosti genu *eta*

1 – 5 : kolonie *S. aureus* 1039 lyzogenizované fágem ϕ841

6 – 10 : kolonie *S. aureus* 1039 lyzogenizované fágem ϕ236

U vybraných lyzogenů byla provedena makrorestrikční analýza pomocí PFGE (obr. 33 a obr. 34).

Obrázek 33: Elektroforetogram PFGE lyzogenů *S. aureus* 1039 (ϕ841+)

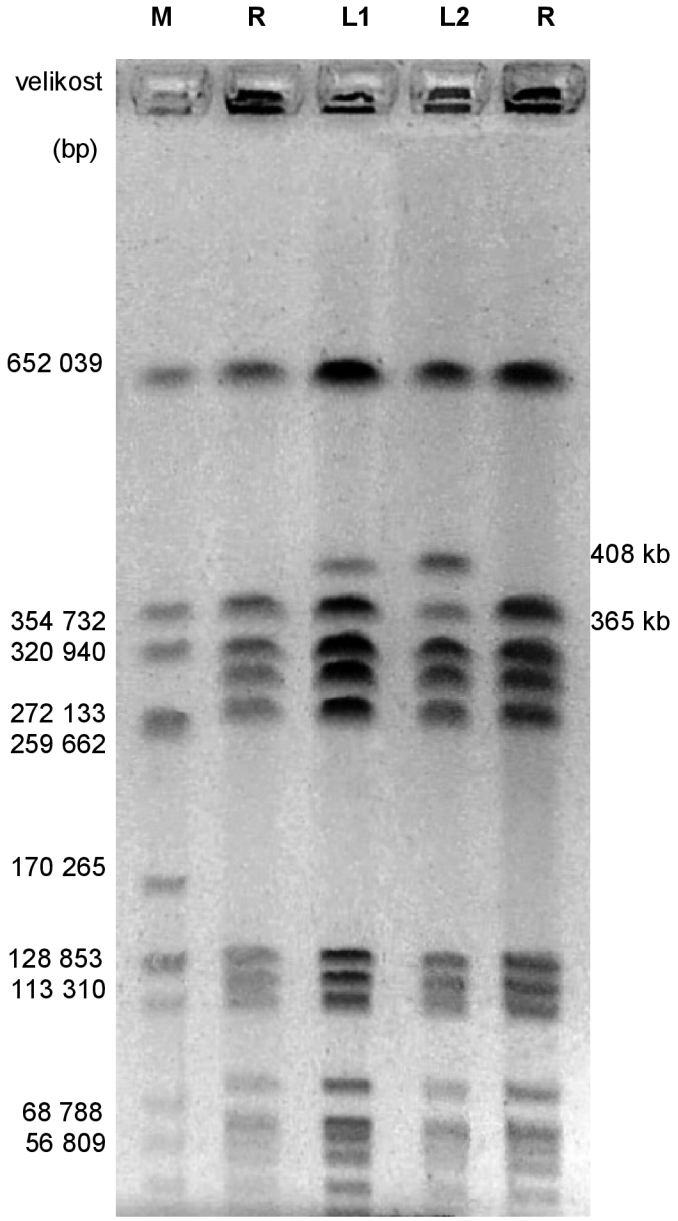


M: velikostní marker, štěpená DNA kmene *S. aureus* NCTC 8325 (NC_007795)

- velikost fragmentů zjištěna na základě *in silico* PFGE (http://insilico.ehu.es)

L1, L2: lyzogeny 1039 (ϕ841+) **R:** recipientní kmen 1039

Obrázek 34: Elektroforetogram PFGE lyzogenů *S. aureus* 1039 (ϕ236+)



M: velikostní marker, štěpená DNA kmene *S. aureus* NCTC 8325 (NC_007795)
- velikost fragmentů zjištěna na základě *in silico* PFGE (http://insilico.ehu.es)
L1, L2: lyzogeny 1039 (ϕ236+) **R**: recipientní kmen 1039

Z výsledků PFGE vyplývá, že genom fága ϕ841 i ϕ236 se začlenil do druhého největšího *Sma*I restrikčního fragmentu kmene 1039. Velikost tohoto fragmentu tak vzrostla z původních asi 365 kb na přibližně 408 kb (odhad proveden pomocí programu ANAGEL 1.2).

Lyzogeny 1039 (ϕ236+) a 1039 (ϕ841+) ověřené makrorestrikční analýzou byly zaslány do NRL SZÚ pro stafylokoky v Praze, kde byla testována produkce exfoliativního toxinu A metodou RPLA. Výsledky shrnuje tabulka 33.

Tabulka 33: Intenzita produkce ETA u lyzogenů 1039 (ϕ236+) a 1039 (ϕ841+) detekovaná metodou RPLA

Kmen 1039 (ϕ236+)	**Intenzita produkce ETA[1]**
L1	+++
L2	+++
L3	+++
Kmen 1039 (ϕ841+)	
L1	+++
L2	+++

[1] detekce proběhla při ředění 1/1000

+++ vysoká hladina produkovaného ETA

5. Diskuze

Téma mé diplomové práce bylo vybráno na základě aktuálních poznatků získaných dlouhodobým sledováním epidemiologické situace a genotypizace exfoliatin A produkujících kmenů *Staphylococcus aureus*, které způsobily závažné epidermolýzy v nemocničním prostředí v České republice (Růžičková *et al.*, 2012). Dosavadní zkušenosti ukazují, že jejich toxicita a patogenní vlastnosti zásadně souvisí s obsahem *eta*-pozitivního profága, který se vyznačuje schopností šířit infekčním procesem gen pro ETA v populaci *S. aureus*. Studium biologických vlastností a genomů konvertujících fágů umožňuje objasnit jejich roli nejen v patogenitě, ale i v evolučním vývoji určitých linií kmenů *S. aureus*.

Cílem diplomové práce byla molekulární charakterizace a genomová analýza dvou bakteriofágů patřících do odlišných ETA-B skupin. Hlavním cílem práce bylo dosažení výsledků, které přispějí k základnímu výzkumu *eta*-pozitivních bakteriofágů a k rozšíření znalostí o roli dosud nepopsaných *eta*-pozitivních fágů v epidemiologii a evoluci kmenů *S. aureus* prostřednictvím jejich horizontální genomiky.

Bakteriofágy byly indukovány a izolovány z klinických kmenů *S. aureus* pocházejících z nemocnic v Trnavě a Náchodě. Při indukci bylo použito více režimů vzdálenosti a doby expozice UV záření tak, aby byl výtěžek virionů co nejvyšší. Protože oba klinické kmeny obsahovaly profágy serologických skupin B a Fb, přičemž *eta*-pozitivní bakteriofágy náleží většinou do serologické skupiny B (Růžičková *et al.*, 2004), následovala izolace bakteriofágů seroskupiny B. Izolované bakteriofágy byly nazvány ϕ841 (z kmene 06/841) a ϕ236 (z kmene 08/236). DNA izolovaná z těchto fágů byla následně použita pro detailnější typizaci pomocí PCR, pro restrikční analýzu a bioinformatickou analýzu vybraných genomových úseků. Pro potvrzení schopnosti horizontálního přenosu genu *eta* byla provedena lyzogenizace bezprofágového kmene *S. aureus* s následnou analýzou pomocí PFGE.

Pro ověření, že ϕ236 a ϕ841 náleží do seroskupiny B, byly indukované izoláty nejprve testovány prostřednictvím PCR. Fág ϕ236 byl dále zařazen do podskupiny Bc, fág ϕ841 do podskupiny Ba. Zařazení fágů a kmenů *S. aureus* do ETA-B skupin bylo provedeno pomocí dříve vyvinuté multiplex PCR (Holochová *et al.*, 2010b), která byla na pracovišti LMDM rozšířena o detekci amplikonu P166 o velikosti 306 bp. Zatímco u fága ϕ841 amplikon P166 nebyl přítomen, u donorového kmene 06/841 amplikon P166 detekován byl.

Fág ϕ841 je tak řazen do skupiny ETA-B2a, jeho donorový kmen do skupiny ETA-B2b. Tento výsledek může být ovlivněn přítomností dalšího zjištěného profága typu Fb v genomu donorového kmene, nebo interferencí primerů s jinou částí jeho chromozomu. Z toho vyplývá, že toto zpřesňující dělení skupiny ETA-B2 na podskupiny lze použít jen pro samotné bakteriofágy, přičemž použití u bakteriálního kmene nemusí být přesné a totožné s amplifikací fágové DNA. Bakteriofág ϕ236 byl zařazen do skupiny ETA-B5, což je doposud nepopsaný ETA-B typ.

PCR genotypizace, mapující přítomnost 12 vybraných genů/ORF dle Holochová *et al.* (2010a), byla rozšířena o detekci sekvence R234 a P166 (pomocí primerů navržených již dříve v LMDM) a sekvence ETA2-18 (primery navrženými v této práci). Výsledek genotypizace ukázal stejný profil modulární struktury fága ϕETA2 a ϕ841. Oba jsou zástupci skupiny ETA-B2 a podskupiny B2a, pro kterou byla v rámci ostatních ETA-B skupin charakteristická sekvence ETA2-18. S ostatními srovnávanými fágy mají společné geny *int*, *orf57-58*, *orf62-63*, *hol*, *ami* a *eta*. Tyto geny je tedy možno v rámci *eta*-fágů označit za konzervativní. Bylo zjištěno, že fág ϕ236 má jedinečný genotypový profil a jako první popsaný zástupce skupiny ETA-B5 charakterizuje genomický profil celé této skupiny. Fágu ϕ236 je svým genotypovým profilem nejblíže fág ϕETA (ETA-B1), u kterého je ovšem detekována sekvence *int-orf2*, nacházející se v modulu lyzogenie.

Zatímco gen pro integrázu je přítomen u všech srovnávaných fágů, gen pro excizionázu (*xis*) chybí u fágů ϕETA (skupina ETA-B1), ϕ236 (skupina ETA-B5) a ϕ166 (skupina ETA-B6). Produkty obou genů jsou přitom nezbytné pro vyčlenění profágové DNA z genomu bakterie (Ye *et al.*, 1990). U fága ϕETA funkci excizionázy zastává pravděpodobně produkt genu *orf2* (Yamaguchi *et al.*, 2000). Přestože u fága ϕ236 nebyla detekována excizionáza v oblasti *xis* ani *int-orf2*, při indukci UV zářením byl profág snadno vyčleněn z genomu donorového kmene. Na procesu excize se tak pravděpodobně podílí jiný, dosud neznámý typ excizionázy, případně dosud nepopsaný proteinový komplex. Případně mohla funkci excizionázy převzít integráza, jejíž proteinová sekvence je u ϕ236 pozměněna (viz. dále). Integráza pak může excizi katalyzovat sama nebo v interakci s bakteriálním proteinovým komplexem.

Genotypové profily obou zkoumaných fágů se mezi sebou výrazně liší. U fága ϕ236 nebyl přítomen gen *xis,* sekvence R234 ani ETA2-18, které v genomu fága ϕ841 přítomny byly. U fága ϕ236 byly dále detekovány geny *terL*, *por* a segmenty P2 a C4, jež genom fága

ϕ841 neobsahuje. Amplikon ETA2-18 detekuje gen pro portálový protein kódovaný *orf43*, který je zcela odlišný od genu pro portálový protein ostatních *eta*-pozitivních bakteriofágů. Ze srovnání sekvence genu *orf43* fága ϕETA2 s ostatními fágovými sekvencemi v databázi GenBank vyplývá, že gen je v 97 % identický s genem pro portálový protein *eta*-negativních fágů: bakteriofága 69 (AY954951) a fága ϕ11 (AF424781). Genotypizace tedy potvrdila značnou variabilitu v genomech *eta*-fágů, ale i přítomnost konzervovaných oblastí. Iandolo *et al*. (2002) provedli srovnávací genomovou analýzu z níž vyplývá, že fágy ϕ11, ϕMu50B a ϕETA jsou blízce příbuzné a ϕ11 a ϕMu50B navíc divergovaly teprve v nedávné minulosti.

Analýza restrikčních profilů DNA fágů ϕ236 a ϕ841 ukázala, že se oba fágy od sebe výrazně liší. Zatímco ϕ236 má restrikční spektrum *Hin*dIII složené ze 14 fragmentů, fág ϕ841 z 21 pozorovatelných fragmentů. Přes vzájemnou odlišnost vzorů mají oba fágy tři společné fragmenty, první o velikosti 3700 bp (společný všem srovnávaným *eta*-fágům mimo ϕ122 ze skupiny ETA-B4), druhý o velikosti 2100 bp (společný všem srovnávaným *eta*-fágům mimo ϕ166 ze skupiny ETA-B6) a třetí o velikosti 1450 bp (společný všem srovnávaným *eta*-fágům mimo ϕ166 a ϕ532 ze skupiny ETA-B1). Přítomnost společných fragmentů je pravděpodobně spojena s modulárním uspořádáním fágových genomů, umožňujícím časté výměny genomových úseků (Belcaid *et al*., 2010). Rekombinace mezi fágy infikující stejného hostitele navíc probíhá s vyšší frekvencí než mezi fágy s fylogeneticky vzdálenějšími hostiteli (Hendrix *et al*., 1999). Přítomnost společných fragmentů u srovnávaných *eta*-pozitivních stafylofágů tedy svědčí o jejich vzájemné příbuznosti.

Vzor restrikčního spektra fága ϕ236 je zcela jedinečný i v rámci zástupců skupiny ETA-B fágů a společně s PCR genotypizací charakterizuje fágovou skupinu ETA-B5. Spektrum fága ϕ841 se téměř shoduje s *Hin*dIII spektrem fága ϕETA2 (oba náleží do skupiny ETA-B2a). Nejmenší tři fragmenty ϕ841, odpovídající nejmenším fragmentům ϕETA2, nebyly na elektroforetogramu zřetelné, což ovšem může být jen následkem omezeného rozlišení metody (restrikční štěpení ϕETA2 proběhlo *in silico*). Z restrikčních spekter zkoumaných fágů byla odhadnuta velikost jejich genomu programem ANAGEL 1.2 (Mrázek a Španová, 1992). Přes relativní nepřesnost tohoto odhadu byla velikost genomu ϕ841 (po přičtení tří nejmenších fragmentů ϕETA2) stanovena na 43,2 kb, což odpovídá velikosti genomu fága ϕETA2. Pro potvrzení totožnosti fágů ϕ841 a ϕETA2 by byla nutná sekvenace celého genomu ϕ841, protože i shodná velikost restrikčních fragmentů nemusí znamenat sekvenční identitu DNA obou fágů. Velikost genomu fága ϕ236 je asi 43,5 kb a odpovídá tak

velikostem genomu sekvenovaných *eta*-fágů v databázi GenBank. Kwan *et al.* (2005) rozdělili 27 bakteriofágů *S. aureus* do tří skupin dle velikosti jejich genomu (první skupina zahrnuje fágy s velikostí genomu pod 20 kb, druhá s genomem kolem 40 kb a do třetí spadají fágy s genomem větším než 125 kb). Do studie byly zahrnuty také výše zmíněné fágy 55, 71 a 69, které byly zařazeny do druhé skupiny (~ 40 kb). Do této skupiny lze zařadit i studované fágy ϕ841 a ϕ236.

Vzhledem ke shodě vzoru spekter restrikčních fragmentů a PCR genotypizace fágů ϕ841 a ϕETA2 byl pro další analýzu vybrán 18. fragment spektra ϕ841/ϕETA2, který je v porovnání se spektry zástupců ostatních ETA-B skupin jedinečný. Sekvence fragmentu byla získána ze sekvence ϕETA2 (AP008953) pomocí programu NEBcutter V2.0 (BioLabs Inc., UK) a dále označena jako ETA2-18. Byla identifikována jako součást genu *orf43* pro portálový protein rodiny SPP1 (fágový modul pro proteiny hlavy). Portálový protein vytváří otvor, který umožňuje prostup DNA při sbalování a ejekci, dále také tvoří spojení mezi fágovou hlavou a proteiny bičíku. Ve funkčním stavu tvoří dodekamer jednotlivých polypeptidů. Při morfogenezi se dále podílí na sestavování prokapsidy. Je zajímavé, že gen pro tento portálový protein není shodný s obdobnými geny *por* u dalších sekvenovaných *eta*-fágů. Programem BLAST (NCBI) byla nalezena 97% shoda se 100% pokrytím u *eta*-negativních fágů, bakteriofága 69 (AY954951) a fága ϕ11 (AF424781). Tato skutečnost je zřejmě dána rekombinacemi mezi fágovými moduly při infekci hostitele oběma fágy (Hendrix *et al.*, 1999).

Pro potvrzení sekvenční identity 18. fragmentu, společného fágům ϕETA2 a ϕ841, byly nově navrženy primery vymezující amplikon ETA2-18. Pomocí navržené PCR byla detekována přítomnost amplikonu u ϕ841, dalších fágů jednotlivých ETA-B skupin a u klinických kmenů *S. aureus*. Amplikon o velikosti 147 bp vznikal jen u fága ϕ841 a klinických kmenů *S. aureus* obsahujících profága skupiny ETA-B2. Tento výsledek potvrzuje blízkou příbuznost fága ϕ841 a ϕETA2 a dále umožňuje identifikaci B2 fágů a kmenů pomocí jednoduché PCR s přidanou detekcí genu *eta*. Gen pro portálový protein *orf43* je detekován i pomocí amplikonu SGBa (viz kapitola 4.3.1.), pomocí kterého je fág zařazen do serologické podskupiny Ba (Kahánková *et al.*, 2010). Obě detekce však nejsou zaměnitelné, jak ukázala *in silico* PCR fágů ϕETA2 a SAP-26. SGBa amplikon vzniká v obou případech, ETA2-18 amplikon však jen u fága ϕETA2.

Pro bližší charakterizaci genomu fága ϕ236 byl pro další analýzu vybrán jedinečný 12. fragment o velikosti 1000 – 1040 bp. Po jeho klonování a sekvenaci byla získána sekvence R236 o délce 1001 nt, obsahující dva otevřené čtecí rámce. ORF v pozici 139 – 999 nt odpovídá části genu pro integrázu *eta*-pozitivních fágů ϕETA, ϕETA2 a ϕETA3, a dále *eta*-negativních fágů 55, 71 (oba jsou členy mezinárodní řady typových fágů pro fagotypizaci) a SAP-26. Fág SAP-26 vykazuje lytickou aktivitu proti širokému spektru MRSA kmenů *S. aureus* a ve spojení s použitím rifampicinu dokáže degradovat a odstranit biofilm tvořený *S. aureus* (Rahman *et al.*, 2011). Integráza je místně specifická tyrozinová rekombináza s C-katalytickou doménou. Enzym integruje virový genom do specifických míst v genomu hostitele. Integráza výše zmíněných fágů je typu Sa1 (Goerke *et al.*, 2009). Srovnáním sekvence R236 se sekvencí genu pro integrázu ostatních Sa1int fágů bylo zjištěno, že v sekvenci R236 došlo k transverzní substituci adeninu za thymin, mající za následek náhradu argininu v aminokyselinovém řetězci integrázy v pozici 41 za serin. Predikcí sekundární struktury enzymu nástrojem PSIPRED (Buchan *et al.*, 2010) bylo zjištěno, že uvedená substituce nemá vliv na sekundární strukturu integrázy. Otázkou však je, zda nedošlo ke změnám i v oblasti genu pro integrázu, která leží mimo sekvenci R236. Pak mohlo dojít ke změnám ve struktuře s případnou změnou ve funkci exprimovaného proteinu.

Druhá část sekvence R236 o velikosti 138 nt zahrnuje ORF v pozici 1 – 123 nt a odpovídá části sekvence genomu fága ϕMR25 bez známé funkce. Za touto částí sekvence u fága ϕMR25 následuje gen pro integrázu, který však nevykazuje podobnost se sekvencí R236. Toto zjištění potvrzuje mozaikovou strukturu fágového genomu. Sekvence se tedy skládá z části původního genu pro integrázu (společného všem Sa1int fágům) a z části odpovídající úseku genomu fága ϕMR25 (získané rekombinací z DNA jiného fága). Fág ϕMR25 infikuje široké spektrum hostitelských kmenů *S. aureus* a dle studie Hoshiba *et al.* (2010) má slibný terapeutický potenciál.

In silico lokalizace genu pro integrázu do jednotlivých fragmentů *Hin*dIII restrikčního spektra Sa1int fágů ϕETA, ϕETA2, ϕETA3 a fága 55 a 71 ukázala, že část sekvence *int* odpovídající R236 je součástí různě velkých fragmentů, což je pravděpodobně důsledek rekombinací úseků DNA s různými *Hin*dIII restrikčními místy. Velikostně podobné jsou si jen fragmenty s částí genu *int* fágů ϕETA2 a ϕETA3. Naopak fragment o velikosti 235 bp se zbývající částí genu *int,* tvořící koncový úsek genomu, je pro sekvenované *eta*-pozitivní

fágy společný. V restrikčním spektru fága ϕ236 se nalézá fragment obdobné velikosti a je tedy možně, že zbylý úsek genu pro integrázu je lokalizován právě v něm.

Již dříve bylo zjištěno, že indukované *eta*-pozitivní fágy skupiny ETA-B1 a skupiny ETA-B4 jsou schopné pozitivní lyzogenizace a konverze produkce ETA. Bylo také prokázáno, že fágy měly shodné místo integrace ve druhém největším *Sma*I fragmentu recipientního kmene (Růžičková *et al.,* 2004; Holochová *et al.,* 2010a) jako ϕETA (Yamaguchi *et al.,* 2000). Pozitivní lyzogenní konverze ETA byla v minulosti potvrzena i u dalších *eta*-pozitivních fágů (Endo *et al*., 2003; Yoshizawa *et al*., 2000).

V této diplomové práci byl podroben lyzogenizaci bezprofágový kmen *S. aureus* 1039 dvěma indukovanými fágy. Výsledky experimentu s fágem ϕ841 i ϕ236 ukazují, že došlo k úspěšnému horizontálnímu přenosu genu *eta* a konverzi ETA u nepatogenního kmene v producenta exfoliativního toxinu A, což bylo potvrzeno metodou RPLA. Produkce exfoliativního toxinu A byla u všech lyzogenů poměrně vysoká, lyzogeny zkoumaných fágů jsou tak z epidemiologického hlediska značně rizikové. Přenos genu *eta* byl prokázán u lyzogenů metodou PCR a začlenění genomu zkoumaných fágů do genomu hostitelské bakterie bylo prokázáno pomocí PFGE. Je známo, že obsah profágů do určité míry zasahuje do vzoru makrorestrikčních spekter jednotlivých kmenů. Podle dřívějších zjištění (Růžičková *et al*., 2004; Holochová *et al*., 2010a) jsou profágy serologické skupiny B obvykle začleněny v té oblasti genomu, která po štěpení restrikční endonukleázou *Sma*I poskytuje druhý největší fragment DNA. Stejně se integrovaly profágy ϕ841 a ϕ236.

Výsledky lyzogenizace části kultur kmene *S. aureus* 1039 fágem ϕ236 ukázaly, že zatímco k přenosu genu *eta* došlo, k začlenění genomu fága do genomu bakterie nikoliv. Může se jednat o nestabilní stav, tzv. pseudolyzogenii, kdy je pozastaven vývoj bakteriofága v hostitelské buňce (Ripp a Miller, 1998). V tomto stavu neprobíhá ani multiplikace fágového genomu (jako při lytickém cyklu), ani jeho replikace spojená s buněčným cyklem a stabilním začleněním do bakteriálního genomu (při lyzogenním cyklu). Zároveň není fágový genom degradován, což umožňuje opětovný start lytického nebo lyzogenního cyklu. Navození stavu pseudolyzogenie není zcela známo, pravděpodobně je vyvolán faktory působícími nepříznivě na růst hostitelské bakterie. U fágů *S. aureus* nebyl stav pseudolyzogenie dosud podrobněji popsán.

Růžičková *et al*. (2012) dříve zjistili, že *eta*-pozitivní profágy typu ETA-B2 se vyskytují u ETA produkujících kmenů *S. aureus* zařazených do klonální linie ST88,

zatímco profágy typu ETA-B5 jsou u kmenů zařazených do klonální linie sekvenčního typu ST121. To vedlo k předpokladu, že genotypová odlišnost kmenů odráží heterogenitu variabilní složky genomu reprezentované profágy. Z obou výše uvedených klonálních typů pocházely klinické kmeny, které byly vybrány pro indukci fágů. Molekulární analýza genomu obou indukovaných fágů potvrdila jejich vzájemnou odlišnost.

Na závěr lze shrnout, že studium dvou *eta*-pozitivních fágů izolovaných z klinických kmenů *S. aureus* v této práci rozšiřuje dosavadní znalosti o biologických vlastnostech ETA-konvertujích bakteriofágů o nové poznatky o struktuře genomu a vlastnostech těchto jedinečných fágů, které mají významnou roli v horizontální genomice a molekulární epidemiologii kmenů *S. aureus*.

6. Závěr

Předložená diplomová práce byla zaměřena na molekulární charakteristiku a analýzu genomů dvou ETA-konvertujících bakteriofágů izolovaných z vybraných klinických kmenů *S. aureus* pocházejících ze slovenské nemocnice v Trnavě (2006) a české porodnice v Náchodě (2008). Při řešení diplomové práce bylo dosaženo těchto výsledků:

1. Byly indukovány a izolovány bakteriofágy ϕ841 a ϕ236. Zkoumané fágy byly zařazeny do seroskupiny B a jejích podskupin. Byla určena ETA-B skupina, kdy ϕ236 náleží do skupiny dosud nepopsaných fágů ETA-B5. Detekcí metodou PCR se ukázalo, že podskupiny v rámci typu ETA-B2 lze přesně určit pouze u bakteriofágů.
2. PCR genotypizací patnácti genů lokalizovaných do jednotlivých genomových modulů bylo zjištěno, že fág ϕ841 je pravděpodobně shodný s ϕETA2, zatímco ϕ236 má jedinečný genotypový profil. Do spektra detekovaných genů byly přidány sekvence identifikované již dříve na pracovišti LMDM a gen *orf43* pro portálový protein ϕETA2. Primery pro jeho detekci byly navrženy v této práci. Detekce *orf43* a genu *eta* představuje jednoduchou a spolehlivou metodu pro identifikaci ETA-B2 fágů i kmenů *S. aureus*.
3. Restrikční analýza DNA štěpené *Hin*dIII restriktázou potvrdila blízkou příbuznost fágů ϕ841 a ϕETA2. Fág ϕ236 má zcela jedinečné restrikční spektrum. Byla odhadnuta velikost genomu studovaných fágů, která odpovídá velikosti genomů sekvenovaných *eta*-fágů.
4. Analýza klonovaného 12. fragmentu *Hin*dIII restrikčního spektra ϕ236 potvrdila modulární uspořádání fágového genomu podléhajícího rekombinacím s genomovými úseky jiných fágů a odhalila bodovou mutaci v genu pro integrázu ϕ236.
5. Lyzogenizací nepatogenního kmene *S. aureus* fágy ϕ841 a ϕ236 byla prokázána jejich schopnost horizontálního přenosu genu *eta* a konverze ETA. Připravené lyzogeny budou použity k uchování genomu obou fágů pro další analýzy.

Výsledky práce přispívají k základnímu výzkumu ETA-konvertujících fágů *S. aureus* a umožňují zpřesnit jejich identifikaci a charakterizaci. Navíc poskytují využití nové metody typizace *eta*-pozitivních fágů serologické skupiny B.

7. Summary

This diploma thesis is focused on molecular characterization and analysis of genomes of two ETA-converting bacteriophages isolated from selected clinical *S. aureus* strains, which have come from Slovak hospital in Trnava (2006) and Czech maternity hospital in Náchod (2008). I have reached the following results:

1. Bacteriophages ϕ841 and ϕ236 were induced and isolated. They were classified into serogroup B and its subgroups. ETA-B group was determined, especially ϕ236 was classified into group of still undescribed ETA-B5 phages. PCR detection of subgroups of ETA-B2 revealed that this detection can be used only for bacteriophages.
2. PCR genotyping of fifteen genes located in different modules of phage DNA indicated that phages ϕ841 and ϕETA2 are probably identical, while ϕ236 has the unique profile. Another three genes were identified, of which two were detected before and for the third gene (*orf43* for portal protein of ϕETA2) new PCR was designed. Detection of *orf43* together with *eta* gene is a simple and reliable method for identification of ETA-B2 phages and *S. aureus* strains.
3. Restriction analysis of the phage DNA cleaved by restriction endonuclease *Hin*dIII confirmed close affinity between ϕ841 and ϕETA2. Phage ϕ236 has the unique restriction spectrum. The size of each phage genome was estimated, so it corresponds to size of other genomes of sequenced *eta*-phages.
4. Analysis of cloned 12. *Hin*dIII restriction fragment of ϕ236 confirmed the modular organization of phage genome affected by recombination with parts of genome of another phages. A point mutation in gene for integrase of ϕ236 was detected.
5. The ability of horizontal gene transfer of *eta* gene and ETA-conversion by ϕ841 and ϕ236 was proved by lysogenization of nonpathogenic *S. aureus* strain 1039. Prepared lysogens will serve to preservation of phage genomes to another analyses.

Results of this thesis contribute to basic research of ETA-converting phages of *S. aureus* and allow to specify their identification and characterization. Furthermore, this thesis provides a new typing method of *eta*-phages.

LITERATURA

Amagai, M. 2003. Desmoglein as a target in autoimmunity and infection, J. Am. Acad. Dermatol. 48: 244-252.

Amagai, M., Matsuyoshi, N., Wang, Z. H., Andl, C. and Stanley, J. R. 2000. Toxin in bullous impetigo and staphylococcal scalded-skin syndrome targets desmoglein 1. Nat. Med. 6: 1275-1277.

Arnemann, J., Sullivan, K. H., Magee, A. I., King, I. A. and Buxton, R. S. 1993. Stratification-related expression of isoforms of the desmosomal cadherins in human epidermis. J. Cell. Sci. 104: 741-750.

Bae, T., Baba, T., Hiramatsu, K. and Schneewind, O. 2006. Prophages of *Staphylococcus aureus* Newman and their contribution to virulence. Mol. Microbiol. 62: 1035-1047.

Baba, T., Bae, T., Schneewind, O., Takeuchi, F. and Hiramatsu, K. 2008. Genome sequence of *Staphylococcus aureus* strain Newman and comparative analysis of staphylococcal genomes: polymorphism and evolution of two major pathogenicity islands. J. Bacteriol. 190: 300-310.

Belcaid, M., Bergeron, A. and Poisson, G. 2010.Mosaic Graphs and Comparative Genomics in Phage Communities. J. Comput. Biol. 17: 1315–1326.

Bikandi, J., San Millán, R., Rementeria, A. and Garaizar, J. 2004. In silico analysis of complete bacterial genomes: PCR, AFLP-PCR, and endonuclease restriction. Bioinformatics 20: 798-799.

Botstein, D. 1980. A theory of modular evolution for bacteriophages. Ann N. Y. Acad. Sci. 354: 484-490.

Buchan, D. W., Ward, S. M., Lobley, A. E., Nugent, T. C., Bryson, K. and Jones, D.T. 2010. Protein annotation and modelling servers at University College London. Nucl. Acids Res. 38: 563-568.

Bukowski, M., Wladyka, B. and Dubin, G. 2010. Exfoliative toxins of *Staphylococcus aureus*. Toxins. 2: 1148-1165.

Campbell, A. M. 1992. Chromosomal insertion sites for phages and plasmids. J. Bacteriol. 174: 7495-7499.

Carroll, D., Kehoe, M. A., Cavanagh, D. and Coleman, D. C. 1995. Novel organization of the site-specific integration and excision recombination functions of the *Staphylococcus aureus* serotype F virulence-converting phages ϕ13 and ϕ42. Mol. Microbiol. 16: 877-893.

Cavarelli, J., Prevost, G., Bourguet, W., Moulinier, L., Chevrier, B., Delagoutte, B., Bilwes, A., Mourey, L., Rifai, S., Piemont, Y. and Moras, D. 1997. The structure of *Staphylococcus aureus* epidermolytic toxin A, an atypic serine protease, at 1.7 A resolution. Structure 5: 813-824.

Cole, C. and Gazewood, J. 2007. Diagnosis and treatment of impetigo. Am. Fam. Physician. 75: 859-864.

Coleman, D., Knights, J., Russell, R., Shanley, D., Birkbeck, T.H., Dougan, G. and Charles, I. 1991. Insertional inactivation of the *Staphylococcus aureus* beta-toxin by bacteriophage ϕ13 occurs by site- and orientation-specific integration of the ϕ13 genome. Mol. Microbiol. 5: 933-939.

Deora, R., Tseng, T. and Misra, T. K. 1997. Alternative transcription factor sigmaSB of *Staphylococcus aureus*: characterization and role in transcription of the global regulatory locus sar. J. Bacteriol. 179: 6355-6359.

El Helali, N., Carbonne, A., Naas, T., Kerneis, S., Fresco, O., Giovangrandi, Y., Fortineau, N., Nordmann, P. and Astagneau, P. 2005. Nosocomial outbreak of staphylococcal scalded skin syndrome in neonates: epidemiological investigation and control. J. Hosp. Infect. 61: 130-138.

Endo, Y., Yamada, T., Matsunaga, K., Hayakawa, Y., Kaidoh, T. and Takeuchi, S. 2003. Phage conversion of exfoliative toxin A in *Staphylococcus aureus* isolated from cows with mastitis. Vet. Microbiol. 96: 81-90.

Enright, M. C., Day, N. P., Davies, C. E., Peacock, S. J. and Spratt, B. G. 2000. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. J. Clin. Microbiol. 38: 1008-1015.

Euzéby, J. P. 2013. LPSN (List of Procaryotic Names with Standing in Nomenclature). (10.2.2013). http://www.bacterio.cict.fr/.

Eyre, R. W. and Stanley, J. R. 1987. Human autoantibodies against a desmosomal protein complex with a calcium-sensitive epitope are characteristic of *pemphigus foliaceus* patients. J. Exp. Med. 165: 1719-1724.

Faden, H. 2003. Neonatal staphylococcal skin infections. Pediatr. Infect. Dis. J., 22: 389.

Feil, E. J., Cooper, J. E., Grundmann, H., Robinson, D. A., Enright, M. C., Berendt, T., Peacock, S. J., Smith, J. M., Murphy, M., Spratt, B. G., Moore, C. E. and Day, N. P. J. 2003. How Clonal Is *Staphylococcus aureus*?. J. Bacteriol. 185: 3307-3316.

Fournier, B. and Hooper, D. C. 2000. A new two-component regulatory system involved in adhesion, autolysis, and extracellular proteolytic activity of *Staphylococcus aureus.* J. Bacteriol. 182: 3955-3964.

Genestier, A. L., Michallet, M. C., Prevost, G., Bellot, G., Chalabreysse, L., Peyrol, S., Thivolet, F., Etienne, J., Lina, G., Vallette, F. M., Vandenesh, F. and Genestier, L. 2005. *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine leukocidin directly targets mitochondria and induces Bax-independent apoptosis of human neutrophils. J. Clin. Invest. 115: 3117-3127.

Giraudo, A. T., Cheung, A. L. and Nagel, R. 1997. The *sae* locus of *Staphylococcus aureus* controls exoprotein synthesis at the transcriptional level. Arch. Microbiol. 168: 53-58.

Goerke, C., Pantůček, R., Holtfreter, S., Schulte, B., Zink, M., Grumann, D., Bröker, B. M., Doškař, J. and Wolz, C. 2009. Diversity of prophages in dominant *Staphylococcus aureus* clonal lineages. J. Bacteriol. 191: 3462-3468.

Hanakawa, Y. and Stanley, J. R. 2004. Mechanisms of blister formation by staphylococcal toxins. J. Biochem. 136: 747-750.

Hanakawa, Y., Schechter, N. M., Lin, C., Nishifuji, K., Amagai, M. and Stanley, J. R. 2004. Enzymatic and molecular characteristics of the efficiency and specificity of exfoliative toxin cleavage of desmoglein 1. J. Biol. Chem. 279: 5268-5277.

Hanakawa, Y., Schechter, N. M., Lin, C., Garza, L., Li, H., Yamaguchi, T., Fudaba, Y., Nishifuji, K., Sugai, M. , Amagai, M. and Stanley, J. R. 2002. Molecular mechanisms of blister formation in bullous impetigo and staphylococcal scalded skin syndrome. J. Clin. Invest. 110: 53-60.

Hendrix, R. W., Smith, M. C., Burns, R. N., Ford, M. E. and Hatfull, G. F. 1999. Evolutionary relationships among diverse bacteriophages and prophages: all the world´s a phage. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 96: 2192-2197.

Holečková, B., Holoda, E., Fotta, M., Kalinácova, V., Gondol', J. and Grolmus J. 2002. Occurrence of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in food. Ann. Agric. Environ. Med. 9: 179-182.

Holochová, P., Růžičková, V., Dostálová, L., Pantůček, R., Petráš, P. and Doškař, J. 2010b. Rapid detection and differentiation of the exfoliative toxin A-producing *Staphylococcus aureus* strains based on ϕETA prophage polymorphisms. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 66: 248-252.

Holochová, P., Růžičková, V., Pantůček, R., Petráš, P., Janisch, R. and Doškař, J. 2010a. Genomic diversity of two lineages of exfoliative toxin A-converting phages predominating in *Staphylococcus aureus* strains in the Czech Republic. Res. Microbiol. 161: 260-267.

Hoshiba, H., Uchiyama, J., Kato, S., Ujihara, T., Muraoka, A., Daibata, M., Wakiguchi, H. and Matsuzaki, S. 2010. Isolation and characterization of a novel *Staphylococcus aureus* bacteriophage, ϕMR25, and its therapeutic potential. Arch. Virol. 155: 545-52.

Chan, P. F. and Foster, S. J. 1998. The role of environmental factors in the regulation of virulence-determinant expression in *Staphylococcus aureus* 8325-4. Microbiology 144: 2469-2479.

Choi, Y. W.,Kotzin, B., Herron, L., Callahan, J., Marrack, P. and Kappler, J. 1989. Interaction of *Staphylococcus aureus* toxin "superantigens" with human T cells. Proc. Natl. Acad.Sci. USA 86: 8941-8945.

Iandolo, J. J., Worrell, V., Groicher, K. H., Qian, Y., Tian, R. Kenton, S., Dorman, A., Ji, H., Lin, S., Loh, P., Qi, S., Zhu, H. And Roe, B. A. 2002. Comparative analysis of the genomes of the temperate bacteriophages ϕ11, ϕ12 and ϕ13 of *Staphylococcus aureus* 8325. Gene. 289: 109-118.

Jarraud, S., Lyon, G. J., Figueiredo, A. M., Gerard, L., Vandenesch, F., Etienne, J., Muir, T. W. and Novick , R. P. 2000. Exfoliatin-producing strains define a fourth *agr* specificity group in *Staphylococcus aureus.* J. Bacteriol. 182: 6517-6522.

Jeyakumari, D., Gopal, R., Eswaran, M. and Maheshkumar, C. 2009. Staphylococcal scalded skin syndrome in a newborn. J. Glob. Infect. Dis. 1: 45-47.

Ji, G., Beavis, R. and Novick , R. P. 1997. Bacterial interference caused by autoinducing peptide variants. Science 276: 2027-2030.

Kahánková, J., Pantůček, R., Goerke, C., Růžičková, V., Holochová, P. and Doškař, J. 2010. Multilocus PCR typing strategy for differentiation of *Staphylococcus aureus* siphoviruses reflecting their modular genome structure. Environ. Microbiol. 12: 2527-2538

Kaneko, J., Kimura, T., Narita, S., Tomita, T. and Kamio, Y. 1998. Complete nucleotidesequence and molecular characterization of temperate staphylococcal bacteriophage ϕPVL carrying Panton-Valentine leukocidin genes. Gene. 215: 57-67.

Kaplan, M. H., Chmel, H., Hsieh, H. C., Stephens, A. and Brinsko, V. 1986. Importance of exfoliatin toxin A production by *Staphylococcus aureus* strains isolated from clustered epidemics of neonatal pustulosis. J. Clin. Microbiol. 23: 83-91.

Kato, H., Sugimura, T., Akagi, T., Sato, N., Hashino, K., Maeno, Y., Kazue, T., Eto, G. and Yamakawa, R. 1996. Long-term consequences of Kawasaki disease. A 10- to 21-year follow-up study of 594 patients. Circulation 94: 1379-1385.

Kato, F., Kadomoto, N., Iwamoto, Y., Bunai, K., Komatsuzawa, H. and Sugai, M. 2011. Regulatory mechanism for exfoliative toxin production in *Staphylococcus aureus*. Infect. Immun. 79: 1660-1670.

Kondo, I., Sakurai, S. and Sarai, Y. 1974. New type of exfoliatin obtained from staphylococcal strains, belonging to phage groups other than group II, isolated from patiens with impetigo and Ritter´s disease. Infect. Immun. 10: 851-861.

Kuroda, M., Ohta, T., Uchiyama, I., Baba, T., Yuzawa, H., Kobayashi, I., Cui, L., Oguchi, A., Aoki, K., Nagai, Y., Lian, J., Ito, T., Kanamori, M., Matsumaru, H., Maruyama, A., Murakami, H., Hosoyama, A., Mizutani-Ui, Y., Takahashi, N. K., Sawano, T., Inoue, R., Kaito, C., Sekimizu, K., Hirakawa, H., Kuhara, S., Goto, S., Yabuzaki, J., Kanehisa, M., Yamashita, A., Oshima, K., Furuya, K., Yoshino, C., Shiba, T., Hattori, M., Ogasawara, N., Hayashi, H. and Hiramatsu, K. 2001. Whole genome sequencing of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Lancet. 357: 1225-124.

Kwan, T., Liu, J. DuBow, M., Gros, P. and Pelletier, J. 2005. The complete genomes and proteomes of 27 *Staphylococcus aureus* bacteriophages. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 102: 5164-5179.

Ladhani, S., Joannou, C. L., Lochrie, D. P., Evans, R. W. and Poston, S. M. 1999. Clinical, microbial and biochemical aspects of the exfoliative toxins causing staphylococcal scalded skin syndrome. Clin. Microbiol. Rev. 12: 224-242.

Lamand, V., Dauwalder, O., Tristan, A., Casalegno, J. S., Meugnier, H., Bes, M., Dumitrescu, O., Croze, M., Vandenesch, F., Etienne, J. and Lina, G. 2012. Epidemiological data of staphylococcal scalded skin syndrome in France from 1997 to 2007 and microbiological characteristics of *Staphylococcus aureus* associated strains. Clin. Microbiol. Infect. 18: 514-521.

Laupland, K. B., Church, D. L, Mucenski, M., Sutherland, L. R. and Davies, H. D. 2003.Population-based study of the epidemiology of and the risk factors for invasive *Staphylococcus aureus* infections. J. Infect. Dis. 187: 1452-1459.

Lester, M. R., Hofer, M. F., Renz, H., Trumble, A. E., Gelfand, E. W. and Leung, D. Y. 1995. Modulatory effects of staphylococcal superantigen TSST-1 on IgE synthesis in atopic dermatitis. Clin. Immunol. Immunopathol. 77: 332-338.

Lindsay, J. A. and Holden, M. T. 2004. *Staphylococcus aureus:* superbug, super genome? Trends Microbiol. 12: 378-385.

Loessner, M. J., Gaeng, S. and Scherer, S. 1999. Evidence for a holin-like protein gene fully embedded out of frame in the endolysin gene of *Staphylococcus aureus* bacteriophage 187. J. Bacteriol. 181: 4452-4460.

Lowy, F. 1998. *Staphylococcus aureus* infections. N. Engl. J. Med. 339: 520-532.

Lyell, A. 1967. A review of toxic epidermal necrolysis in Britain. Br. J. Dermatol. 79: 662-671.

Machida, K. 1995. Immunological investigations on pathogenesis of staphylococcal scalded skin syndrome. Rinsho Byori 43: 547-556.

McCaig, L. F., McDonald, L. C., Mandal, S. and Jernigan, D. B. 2006. *Staphylococcus aureus*-associated skin and soft tissue infections in ambulatory care. Emerg. Infect. Dis. 12: 1715-1723.

Melish, M. E., Glasgow, L. A. and Turner, M. D. 1972. The staphylococcal scalded-skin syndrome: isolation and partial characterization of the exfoliative toxin. J. Infect. Dis. 125: 129-140.

Mrázek, J. and Španová, A. 1992. ANAGEL: A personal computer program for evaluating DNA fragment lenghts from distances migrated in an agarose gel. Comput. Appl. Biosci. 8: 524.

Mulligan, M. E., Murray-Leisure, K. A., Ribner, B. S., Standiford, H. C., John, J. F., Korvick, J. A., Kauffman, C. A. and Yu, V. L. 1993. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a consensus review of the microbiology, pathogenesis, and epidemiology with implications for prevention and management. Am. J. Med. 94: 313-328.

NCBI Genome. 2013. (online). (15.3.2013) http://www.ncbi.nlm.nih.gov

Nishifuji, K., Sugai, M. and Amagain, M. 2008. Staphylococcal exfoliative toxins: Molecular scissors“ of bacteria that attack the cutaneous defense barrier in mammals. J. Dermatol. Sci. 49: 21-31.

Novick, R. P. and Subedi, A. 2007. The SaPIs: mobile pathogenicity islands of *Staphylococcus*. Chem. Immunol. Allergy 93: 42-57.

Novick, R. P., Ross, H. F., Projan, S. J., Kornblum, J. Kreiswirth, B. and Moghazeh, S. 1993. Sythesis os staphylococcal virulence factors is controlled by a regulatory RNA molecule. EMBO J. 12: 3967-3975.

Pantůček, R., Doškař, J., Růžičková, V., Kašpárek, P., Oráčová, E., Kvardová, V. and Rosypal, S. 2004. Identification of bacteriophage types and their carriage in *Staphylococcus aureus*. Arch. Virol. 149: 1689-1703.

Rahman, M., Kim, S., Kim, S. M., Seol, S. Y. and Kim, J. 2011. Characterization of induced *Staphylococcus aureus* bacteriophage SAP-26 and its anti-biofilm activity with rifampicin. Biofouling. 27: 1087-1093.

Ripp, S. and Miller, R.V. 1998. Dynamics of the pseudolysogenic response in slowly growing cells of *Pseudomonas aeruginosa*. Microbiology 144: 2225-2232.

Růžičková, V., Pantůček, R., Petráš, P., Doškař, J., Sedláček, I. and Rosypal, S. 2003. Molecular typing of exfoliative toxin-producing *Staphylococcus aureus* strains involved in epidermolytic infections. Int. J. Med. Microbiol. 292: 541-545.

Růžičková, V., Pantůček, R., Petráš, P., Machová, I., Kostýlková, K. and Doškař, J. 2012. Major clonal lineages in impetigo *Staphylococcus aureus strains* in Czech and Slovak maternity hospitals. Int. J. Med. Microbiol. 302: 237-241

Růžičková, V., Pekarová, M., Petráš, P., Pantůček, R. and Doškař, J. 2004. Characterization of resident bacteriophages and their role in conversion of exfoliative toxin A production in *Staphylococcus aureus*. In: Abstract book of the 11th International Symposium

on Staphylococci and Staphylococcal Infections. Charleston, South Carolina, USA, s. 204-204.

Růžičková, V., Voller, J., Pantůček, R., Petráš, P. and Doškař, J. 2005. Multiplex PCR for detection of three exfoliative toxin serotype genes in *Staphylococcus aureus*. Folia Microbiol. 50: 499-502.

Sarlangue, J., Hubert, P., Dageville, C., Boithias, C. and Gottot, S. 1998. Nosocomial infections in pediatrics. Epidemiologic studies, importance of research networks. Members of REAPED research. Arch. Pediatr. 5: 191-194.

Sato, H., Matsumori, Y., Tanabe, T., Saito, H., Shimizu, A. and Kawano, J. 1994. A new type of staphylococcal exfoliative toxin from *Staphylococcus aureus* strain isolated from s horse with phlegmon. Infect. Immun. 62: 3708-3785.

Shirakata, Y., Amagai, M., Hanakawa, Y., Nishikawa, T. and Hashimoto, K. 1998. Lack of mucosal involvement in *pemphigus foliaceus* may be due to low expression of desmoglein 1. J. Invest. Dermatol. 110: 76-78.

Shopsin, B., Gomez, M., Montgomery, S. O., Smith, D. H., Waddington, M., Dodge, D. E., Bost, D. A., Riehman, M., Naidich, S. and Kreiswirth, B. N. 1999. Evaluation of protein A gene polymorphic region DNA sequencing for typing of *Staphylococcus aureus* strains. J. Clin. Microbiol. 37: 3556-3563.

Schlievert, P. M., Nemeth, K. A., Davis, C. C., Peterson, M. L. and Jones, B. E. 2010. *Staphylococcus aureus* exotoxins are present in vivo in tampons. Clin. Vaccine Immunol. 17: 722-727.

Stanley, J. R. and Amagai, M. 2006. *Pemphigus*, bullous impetigo, and the staphylococcal scalded-skin syndrome. N. Engl. J. Med. 355: 1800-1810.

Štěpán, J., Pantůček, R., Růžičková, V., Rosypal, S., Hájek, V. and Doškař, J. 2001. Identification of *Staphylococcus aureus* based on PCR amplification of species specific genomic 826 bp sequence derived from a common 44-kb *Sma*I restriction fragment. Mol. Cell. Probes. 15: 249-257

Sullivan, M. J., Petty, N. K. and Beatson, S. A. 2011. Easyfig: a genome comparison visualiser. Bioinformatics. 27: 1009-1010.

Tegmark, K., Karlsson, A. and Arvidson, S. 2000 Identification and characterization of SarH1, a new global regulator of virulence gene expression in *Staphylococcus aureus*. Mol. Microbiol. 37: 398-409.

Ventura, M. Canchaya, C., Pridmore, D., Berger, B. and Brüssow, H. 2003. Integration and distribution of *Lactobacillus johnsonii* prophages. J. Bacteriol. 185: 4603-4608.

Vincze, T., Posfai, J. and Roberts, R. J. 2003. NEBcutter: a program to cleave DNA with restriction enzymes. Nucleic Acids Res. 31: 3688-3691.

Wertheim, H. F., Vos, M. C., Ott, A., van Belkum, A., Voss, A., Kluytmans, J. A., van Keulen, P. H., Vandenbroucke-Grauls, C. M., Meester, M. H. and Verbrugh, H. A. 2004. Risk and outcome of nosocomial *Staphylococcus aureus* bacteraemia in nasal carriers versus non-carriers. Lancet 364: 703-705.

Wiley, B. B. and Rogolsky, M. 1977. Molecular and serological differentiation of staphylococcal exfoliative toxin synthesized under chromosomal and plasmid control. Infect. Immun. 18: 487-494.

Yamaguchi, T., Hayashi, T., Takami, H., Nakasone, K., Ohnishi, M., Nakayama, K., Yamada, S., Komatsuzawa, H. and Sugai, M. 2000. Phage conversion of exfoliative toxin A production in *Staphylococcus aureus*. Mol. Microbiol. 38: 694-705.

Yamaguchi, T., Nishifuji, K., Sasaki, M., Fudaba, Y., Aepfelbacher, M., Takata, T. Ohara, M., Komatsuzawa, H., Amagai, M. and Sugai, M. 2002. Identification of the *Staphylococcus aureus* etd pathogenicity island which encodes a novel exfoliative toxin, ETD, and EDIN-B. Infect. Immun. 70: 5835-5845.

Yamasaki, O., Yamaguchi, T., Sugai, M., Chapuis-Cellier, C., Arnaud, F., Vandenesch, F., Etienne, J. and Lina, G. 2005. Clinical manifestations of staphylococcal scaled-skin syndrome depend on serotypes of exfoliative toxins. J. Clin. Microbiol. 43: 1890-1893.

Ye, Z. H., Buranen, S. L. and Lee, C. Y. 1990. Sequence analysis and comparison of *int* and *xis* genes from staphylococcal bacteriophages L54a and ϕ11. J. Bacteriol. 172: 2568-2575

Yoshizawa, Y., Sakurada, J., Sakurai, S., Machida, K., Kondo, I. and Masuda, S. 2000. An exfoliative toxin A-converting phage isolated from *Staphylococcus aureus* strain ZM. Microbiol. Immunol. 44: 189-191.

Zhou, Y., Liang, Y., Lynch, K., Dennis, J. J. and Wishart, D. S. 2011. "PHAST: A Fast Phage Search Tool". Nucl. Acids Res. 39: 347-352.