

# Bakterie *Staphylococcus* jako častý zdroj nebezpečí pro člověka

ROMAN PANTŮČEK

## Úvod

Stafylokoky patří k nejdéle studovaným a v přírodě k nejrozšířenějším bakteriím. Jejich buňky jsou nepohyblivé, nesporulující, fakultativně anaerobní, kultivačně poměrně nenáročné a vyskytují se samostatně, ve dvojicích či v hrozníčkovitých seskupeních. Nacházíme je zpravidla v hustších populacích na kůži a sliznicích savců a ptáků. Nejvýznamnějším a nejzajímavějším druhem je *Staphylococcus aureus*, tzv. „zlatý stafylokok“, který patří mezi závažné lidské i zvířecí patogeny. Přibližně u 25 až 30 % zdravých lidí je součástí přirozené mikroflóry a nevyvolává žádné obtíže, avšak dojde-li ke snížení odolnosti jedince, může pronikat do tkání a vyvolávat celou řadu onemocnění od běžných hnisavých kožních infekcí nebo abscesů až po osteomyelitidy, endokarditidy, pneumonie a celkové sepse. Patří k hlavním původcům závažných pooperačních komplikací u pacientů s ortopedickými implantáty a katétrů, u nichž mohou mít významný podíl i další druhy stafylokoků. Nezanedbatelné jsou i stafylokokové toxikózy způsobené bakteriálními kmeny, které produkují rozličné typy superantigenů (proteinů, které jsou schopné polyklonální aktivace lymfocytů s masivním vyplavením cytokinů, jež mohou vést k těžkému celkovému šokovému stavu). Vzhledem k nozokomiálnímu charakteru (nemocniční nákazy) představují stafylokokové infekce vážný a celosvětově přetrvávající epidemiologický problém.

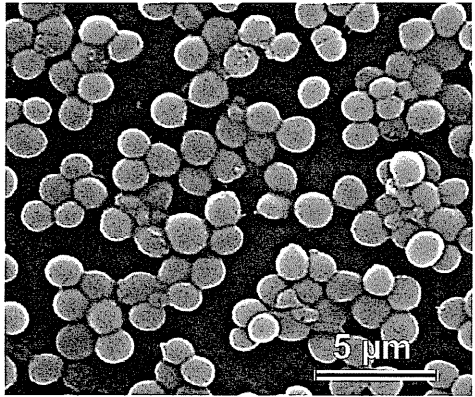
Výzkum patogenních stafylokoků je v současné době orientován především na dvě oblasti. První se týká genetického a biochemického základu rezistence k antibiotikům a způsobů jejího šíření mezi stafylokokovými kmeny, druhá je zaměřena na charakterizaci faktorů, které ovlivňují patogenitu, virulenci, kolonizaci osob, přežívání kmenů v prostředí, vysokou genetickou variabilitu a jejich evoluci.

## Historie objevu a výzkumu stafylokoků

Mezi prvními mikrobiology, kteří si uvědomili souvislost mezi kokovitými bakteriemi a vznikem hnisu, byli francouzský přírodovědec Louis Pasteur a skotský chirurg Alexander Ogston. Jako rok tohoto objevu se obvykle uvádí letopočet 1880. Ogston byl první, kdo rozlišoval dva typy pyogenních (hnis produkujících) koků, jeden s buňkami uspořádanými do hrozníčkovitých shluků, pro který použil označení *Staphylococcus*, a druhý s buňkami uspořádanými do řetízků, nazývaný *Streptococcus*. Jeho zmínka však měla pouze popis-

ný význam. Až německý bakteriolog F. Rosenbach v roce 1884, použil termín v taxonomickém smyslu a poskytl formální popis rodu *Staphylococcus* s druhem *Staphylococcus aureus*.

V pořadí druhý stafylokokový druh byl nalezen jako součást fyziologické kožní mikroflóry Welchem v roce 1891 a označen *Staphylococcus epidermidis albus*. Současné označení *Staphylococcus epidermidis* nese od roku 1916 (Evans). Záhy se zjistilo, že oba stafylokoky lze od sebe dobře odlišit zjištěním schopnosti produkovat enzym označený plazmakoaguláza, který s modifikovaným protrombinem vytváří aktivní komplex přeměňující rozpustný fibrinogen na nerozpustný fibrin v krevní plazmě. Může tak přispívat k ohraničení závažné reakce vytvořením fibrinového lemu kolem léze, která se přeměňuje ve stafylokokový absces. Koaguláza-pozitivní druh *S. aureus* byl považován za patogena, koaguláza-negativní *S. epidermidis* v podstatě za komenzální mikroorganismus.



Typické uspořádání stafylokokových buněk do hrozničkovitých útvarů

Počátkem 19. století byly všechny bakterie kulovitého tvaru zahrnovány do čeledi *Coccaceae*. Flüge v roce 1886 rozlišil na základě hydrolyzy želatiny v rámci koků dva rody: *Staphylococcus* a *Micrococcus*. Mikrokoky byly v této reakci variabilní a byly považovány za saprofytické, zatímco stafylokoky ztekucovaly želatinu a byly považovány za patogenní. Rody *Staphylococcus* a *Micrococcus* zahrnující grampozitivní a kataláza-pozitivní koky byly později společně zařazeny do čeledi *Micrococcaceae*, kde zůstávaly až do nedávné doby. Začátkem 60. let minulého století Baird-Parker provedl velmi rozsáhlé studie stafylokoků a mikrokoků izolovaných z různých zdrojů a klasifikoval tyto mikroorganismy do skupin na základě snadno stanovitelných morfologických, fyziologických a biochemických znaků. Některé z těchto skupin položily základ později popsaným koaguláza-negativním druhům stafylokoků. Přibližně ze stejné doby pocházejí první vědecké práce poukazující na význam genetické analýzy znaků v taxonomii a klasifikaci bakterií, koncipované na Masarykově univerzitě prof. Stanislavem Rosypalem. Je nutno poznamenat, že v tehdejší době ani v mikrobiologii v západních zemích nebyla genetická analýza mezi taxonomy obvyklým přístupem. Ve svém výzkumu se prof. Rosypal ve spolupráci s RNDr. A. Rosypalovou zaměřili na analýzu DNA u mikrokoků a stafylokoků, co se týče obsahu G+C (guaninu a cytosinu). Byla to v té době jediná možná molekulární charakteristika genomu bakterií. Rozdíl

v obsahu G+C ukazovaly na fylogenetickou odlišnost kmenů. Zvláště významná je práce publikovaná v roce 1966 v *Journal of General Microbiology* S. Rosypalem, A. Rosypalovou a J. Hořejšem. Autoři v ní spojili dva přístupy: numerickou taxonomií (Adansonovu analýzu) a analýzu obsahu G+C v DNA. Podařilo se jim takto dokázat, že zástupci rodu *Staphylococcus* mají obsah G+C v genomu v rozmezí 30 – 39 %, zatímco mikrokoky 63 – 73 %, což naznačuje, že tyto rody nejsou příbuzné. Z obecného hlediska lze tyto studie hodnotit nejen jako práce, které se staly základem moderní klasifikace mikrokoků a stafylokoků, ale též jako práce, které stály na počátku směru, který se dnes nazývá molekulární taxonomií. Nepříbuznost obou rodů *Staphylococcus* a *Micrococcus* byla později potvrzena německým týmem vedeným prof. K. H. Schleiferem chemotaxonomickými metodami a publikací jejich sekven- ce 16S rRNA (ribozomální RNA).

V roce 1980 se začal vyvíjet nový přístup pro studium fylogenetických souvislostí a pro molekulární identifikaci bakterií (a samozřejmě i dalších forem organismů), využívající stanovení a srovnání stabilních konzervativních částí genomu. Kandidáty pro tuto analýzu se staly právě geny kódující funkční molekuly rRNA. Gen pro 16S rRNA u bakterií může být srovnáván nejen s 16S rRNA archeí, ale i s 18S rRNA eukaryot a toto srovnání umožňuje jasně definovat operačně taxonomické jednotky fylogenetického stromu. Poslední a nejnovější hierarchická klasifikace grampozitivních koků mezi taxonomickými stupni rod a třída byla definována právě na základě 16S rRNA. Na základě této taxonomické studie byly mikrokoky přeřazeny do aktinomycetové linie (třída *Actinobacteria*; řád *Actinomycetales*) a současně taxonomické zařazení rodu *Staphylococcus* je následující: kmen *Firmicutes*; třída *Bacilli*; řád *Bacillales*; čeleď *Staphylococcaceae*.

## Současný stav v taxonomii rodu *Staphylococcus* a klinický význam dalších druhů stafylokoků

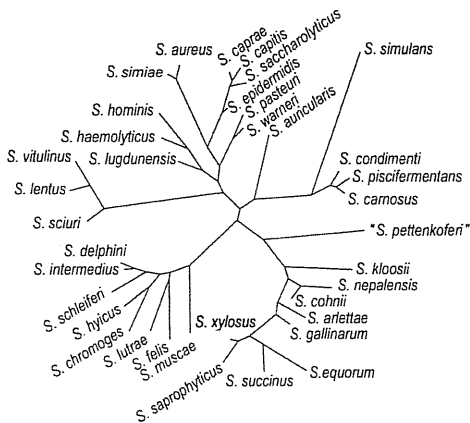
V roce 1975, po více než 50 letech existence dvou nejznámějších druhů, *S. aureus* a *S. epidermidis*, a po objevu třetího druhu *S. saprophyticus* popsá- ného v roce 1951 jako původce infekcí močových cest, byly publikovány dva články, v nichž prof. W. Kloos a prof. K. H. Schleifer popsali objev 7 dalších koaguláza-negativních stafylokoků. Od té doby byl téměř každým rokem až do současnosti objeven dalším novým stafylokokový druh, resp. poddruh. Nové druhy stafylokoků jsou specifické pro některá zvířata, jiné se obvykle vysky- tují v potravinách. Rod *Staphylococcus* zahrnuje v současné době 37 platných druhů, z nichž 9 obsahuje 2 poddruhy a jeden 3 poddruhy.

Do taxonomie rodu *Staphylococcus* se významně zapsal prof. Václav Hájek z Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci. V roce 1976 popsal dru- hý koaguláza-pozitivní druh stafylokoka *S. intermedius*, který – i když se mů- že vyskytnout u celé řady zvířat a vzácně i u člověka – je nejčastější příčinou

infekcí u psů. Další druhy stafylokoků, u nichž je prof. Hájek uveden jako hlavní autor, jsou *S. chromogenes*, *S. muscae* a *S. saprophyticus* subsp. *bovis*. Čerstvou aktualitou v taxonomii stafylokoků je původní práce z našeho pracoviště publikovaná v roce 2005 v mikrobiologickém taxonomickém časopise International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology popisující nový druh *Staphylococcus simiae*, který byl opakovaně izolován z gastrointestinálního traktu kotulů veverovitých (opic čeledi malpovitých), importovaných z deštných pralesů Jižní Ameriky.

Pro definici nového druhu byl aplikován vícefázový taxonomický přístup, kombinující výsledky numerické analýzy fenotypizace a genotypizace doplněné studiem homologie rRNA a celkové chromozomální DNA, a vyžadující použití širokého spektra metod, jejichž náročnost vyžaduje spolupráci specialistů. Dokumentuje to skutečnost, že se na popisu nového druhu podíleli odborníci z olomoucké ZOO, Ústavu mikrobiologie Lékařské fakulty UP v Olomouci, České sbírky mikroorganismů, Národní referenční laboratoře pro stafylokoky SZÚ-CEM, katedry genetiky a molekulární biologie Přírodovědecké fakulty MU a Univerzity v Ghentu v Belgii. Ačkoli *S. simiae* patří mezi koaguláza-negativní druhy, jeho blízká genetická příbuznost s patogenním druhem *S. aureus* může stimulovat výzkum evoluce obou druhů.

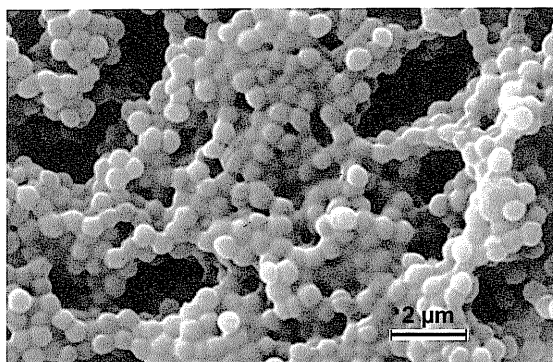
S taxonomickými objevy nových druhů stafylokoků se začaly v 80. letech minulého století objevovat poznatky, že koaguláza-negativní stafylokoky (KNS) nejsou jen součástí fyziologické flóry na kůži a sliznicích, ale že se mohou podílet i na vzniku různých infekčních onemocnění. Dnes jsou obecně



Fylogenetický strom znázorňující vzájemnou příbuznost v současnosti známých druhů stafylokoků



Kotul veverovitý (*Saimiri sciureus* L.),  
foto z Olomoucké ZOO



Mnohavrstvý stafylokokový biofilm tvořený druhem *Staphylococcus epidermidis*, stabilizovaný polysacharidovým intercelulárním adhezivem

ní. Dramatický nárůst infekcí způsobených KNS byl zaznamenán s používáním plastových pomůcek v medicíně, jako jsou umělé srdeční chlopně, umělé klouby, srdeční stimulatory a katétry, protože bakterie jsou schopné velmi efektivní adheze k těmto umělým povrchům a mohou vytvořit mnohavrstvé biofilmy, které se obtížně odstraňují působením imunitního systému nebo se špatně léčí dostupnými antibiotiky. V literatuře se uvádí okolo 20 druhů KNS, které se uplatňují jako etiologická agens v lidských onemocněních.

## Virulence *S. aureus*

*Staphylococcus aureus* je velice „chytrá“ bakterie, která produkuje množství rozmanitých faktorů virulence, jako jsou tkáňově specifické adheziny, cytolytické toxiny, superantigeny, enzymy degradující tkáň a faktory umožňující unikat imunitnímu systému. V závislosti na skutečné sestavě genů kódujících faktory virulence, která může být u jednotlivých bakteriálních kmenů velmi proměnlivá, mohou jednotlivé kmeny *S. aureus* způsobovat široké spektrum onemocnění člověka. K faktorům virulence *S. aureus* patří množství vytvářených bílkovin, antigenů a dalších biologicky aktivních látek, vyskytujících se jednak v komplexní buněčné stěně (např. pouzdro, aglutinogeny, stafylokokový protein A, shlukovací faktor a adheziny) a jednak uvolňovaných do prostředí, např. plazma-koaguláza, stafylokináza, hyaluronidáza, hemolyziny, leukocidiny, exfoliativní toxiny, enterotoxiny, toxin 1 syndromu toxického šoku, inhibitor diferenciacie epidermálních buněk, inhibitor chemotaxe nebo inhibitor komplementu. Řízení produkce mnoha faktorů virulence však není během onemocnění náhodné, ale je pod kontrolou složitých globálních a předatných regulátorových systémů bakterie. K rozvoji infekce nejčastěji dochází v případech, že se jedná o organismus s oslabeným imunitním systémem.

Nejčastějším místem vstupu infekce jsou sliznice horních cest dýchacích nebo poškozená kůže. Vzhledem ke schopnosti stafylokoků adherovat na umělé povrchy představuje potenciální nebezpečí také přítomnost cizorodých implantovaných těles. K invazivním onemocněním způsobeným stafylokoky patří folikulitida (infekce vlasového míšku) a závažnější typy kožních infekcí jako furunkl nebo karbunkl, dále zánět mléčné žlázy u kojících žen, pneumonie často zejména po chřipkových onemocněních, pseudomembranózní enterokolitida, póurazové a pooperační infekce, endokarditida, stafylokoková osteomyelitida (zánět kostní dřevě) a celkové sepse. Při lokálních infekcích se uplatňuje schopnost stafylokoků vytvářet kapsulu (pouzdro polysacharidové povahy), které chrání bakterie před interakcí s bakteriofágy, komplementem, protilátkami a fagocyty a dochází tak ke vzniku hnisavých ložisek. Naopak tvorba některých bílkovin, jako je stafylokináza (fibrinolysin), přispívá k rozpouštění fibrinu vznikajícího při zánětlivém procesu jako projev reparačních pochodů a podporuje tak šíření stafylokokové infekce. Podobně se uplatňuje hyaluronidáza, která hydrolyzuje kyselinu hyaluronovou přítomnou v mezibuněčném tmelu, což umožňuje šíření stafylokoků a jejich extracelulárních produktů. Z ložiska infekce pak může docházet k uvolnění bakterií do krevního řečiště a ke vzniku bakteriémie s následnými komplikacemi prakticky v kterémkoli orgánu.

Jako faktory virulence mají značný význam také stafylokokové toxiny, z nichž některé působí jako superantigeny a jiné vyvolávají závažná onemocnění. Známé jsou alimentární enterotoxikózy (otravy z potravy kontaminované stafylokokovými enterotoxiny), projevující se nevolností, zvracením, bolestí břicha, případně svalovými křečemi, průjmami a zvýšenou teplotou. U enterotoxikóz není na rozdíl od ostatních toxikóz nutná přítomnost živých bakterií v organismu.

Závažnými onemocněními jsou dva stafylokokové syndromy: syndrom toxického šoku a syndrom opařené kůže. Za stafylokokový syndrom toxického šoku odpovídá toxin syndromu toxického šoku TSST-1, který je produkován některými kmeny *S. aureus*. Toto onemocnění se projevuje vysokou horečkou, hypotenzí, vyrážkou, nervovými poruchami, multiorgánovým selháním a šokem, s následným olupováním kůže za 1 až 2 týdny od začátku nemoci. Syndrom je ve 3 až 5 % případů smrtelný. Může se projevit ve dvou formách. První forma se vyskytuje u žen v souvislosti s menses, kdy původcem je kmen *S. aureus*, který je v těchto případech přítomný ve vaginální flóře. Ideální podmínky pro propuknutí syndromu nastanou, pokud žena používá při menstruaci tampony. Druhou formou jsou případy, kdy je syndrom komplikací jakéhokoli jiného stafylokokového onemocnění.

Dalším typem toxinů jsou exfoliatiny (epidermolytické toxiny), které mohou být příčinou vzniku stafylokokového syndromu opařené kůže. Tyto toxiny náleží do rodiny serinových proteáz a způsobují odloučení horní vrstvy epidermis. Vznikají tak epidermální trhliny, které vyplňují tkáňová tekutina, vytvářejí se puchýře a posléze dochází k olupování povrchových vrstev

pokožky. Onemocnění způsobené kmeny *S. aureus* produkujícími exfoliatiny se vyskytuje mnohdy epidemicky u novorozenců v porodnicích, ale naštěstí mívá obvykle mírnou formu, projevující se pouze puchýřnatým onemocněním.

## Rezistence k antibiotikům a vznik vysoce virulentních klonů

Většina stafylokokových druhů má ohromující schopnosti rychle získat rezistenci k antimikrobiálním preparátům. Druh *S. aureus* velmi rychle získal rezistenci proti všem třídám používaných antibiotik jedním ze dvou různých mechanismů: mutacemi existujících bakteriálních genů nebo horizontálním přenosem genů z jiných bakterií téhož nebo jiného druhu. Někteří odborníci vyjadřují současnou situaci v bakteriální rezistenci dokonce jako „celosvětovou kalamitu“ nebo jako „križi antibiotické rezistence“. V současnosti je dokázáno, že *S. aureus* má modulární genom. Kromě standardní složky genomu obsahuje řadu variabilních genetických elementů, z nichž některé jsou mobilní a mohou být přenášeny horizontálně, tedy ne po dědičné linii. Ze všech znaků rezistence, které *S. aureus* získal po zavedení antimikrobiální chemoterapie v třicátých letech minulého století, je z klinického hlediska nejdůležitější rezistence k meticilinu (respektive v našich podmínkách k oxacilinu), protože pouhý jediný genetický element navozuje rezistenci k nejčastěji předepisované třídě  $\beta$ -laktamových antibiotik, která zahrnuje peniciliny, cefalosporiny a karbapenemy. Šest měsíců poté, co byl v roce 1960 uveden na trh meticilin, byly hlášeny první izoláty meticilin-rezistentního *S. aureus* (MRSA) v jižní Anglii. Po několika málo letech se situace ve výskytu MRSA začala dramaticky měnit a multirezistentní MRSA se běžně vyskytovaly v Dánsku, Švýcarsku, Anglii, Francii a Austrálii. Např. v letech 1967 až 1971 vykazovalo v Dánsku 15 % všech izolátů kombinovanou rezistenci k meticilinu, streptomycinu, tetracyklinu a erytromycinu. Odhaduje se, že klony MRSA, které jsou známé v současné době, pocházejí z více než 20 předků, které vznikly v nezávislých genetických událostech po celém světě. Genetický element odpovědný za rezistenci k meticilinu pochází pravděpodobně od některého z koaguláza-negativních druhů stafylokoků, jako jsou u hlodavců se vyskytující *Staphylococcus sciuri* nebo přirozeně rezistentní *Staphylococcus haemolyticus*. K bezprostřednímu přenosu do *S. aureus* však došlo pravděpodobně během antibiotické terapie z *S. epidermidis*. Rezistence stafylokoků k prakticky všem dostupným antibiotikům dnes rozšiřuje spektrum neléčitelných infekcí způsobených bakteriemi. V některých nemocnicích států západní Evropy je 40 % až 60 % (v ČR 5 až 10 %) nozokomiálních infekcí (získaných v nemocničních zařízeních) způsobeno kmeny MRSA, rezistentními také k jiným antibiotikům, nedaří se je eradikovat a působí tak jako velmi nebezpečná hrozba. Většina těchto epidemií je způsobena malým množstvím úspěšných, celosvětově se šířících epidemických klonů (např. iberský klon, brazilský klon, taiwanský klon nebo klony UK

EMRSA-15 a EMRSA-16). Infekce způsobené MRSA jsou obvykle léčeny vankomycinem (glykopeptidové antibiotikum), ale v roce 1997 se objevily první kmeny se sníženou citlivostí k vankomycinu (VISA), u kterých proběhlo několik málo genových mutací. V současné době je v USA již popsáno několik kmenů vysoce rezistentních k vankomycinu (VRSA), které získaly rezistenci konjugativním přenosem prostřednictvím plazmidu od enterokoků. Důvod tohoto dramatického vývoje spočívá v široké a nekontrolovatelné aplikaci antibiotik, ve vlivu dezinfekčních látek v prostředí a v extenzivním používání látek příbuzných antibiotikům ve veterinární oblasti jako růstových promotorů přidávaných do potravy hospodářských zvířat. Protože vývoj nových antibiotik dramaticky zaostává, zůstává otázkou, zdali se v budoucnu podaří opět předstihnout multirezistentní bakterie a z jakých zdrojů budou nová léčiva získána. Z uvedeného vyplývá, že problém bakteriální rezistence je multifaktoriální a jako takový vyžaduje multidisciplinární přístup a spolupráci odborníků na všech úrovních. Řešení problémů rezistence a patogenity je především úzce spjato s detailní analýzou struktury a funkce vnitrodruhové variabilní složky genomu stafylokoků.

Většina dokumentovaných infekcí způsobených MRSA je omezena na nemocniční oddělení, kde pacienti přicházejí do styku s prostředím nemocnice nebo s jinými často dlouhodobě hospitalizovanými a imunokompromitovanými pacienty kolonizovanými MRSA. V komunitním prostředí (ve společnosti) jsou běžné drobné neinvazivní kožní infekce způsobené *S. aureus*. Avšak v roce 1993 se objevil u pacientů v západní Austrálii, kteří nebyli nikdy předtím hospitalizováni, zcela nový kmen MRSA. Publikace této informace vedla na řadě míst ve světě k rozpoznání pozoruhodné evoluce nových vysoce virulentních kmenů adaptovaných právě na komunitní prostředí (jihozápadní pacifický klon, klon USA300 nebo evropský klon ST40). Hlavním důvodem jejich virulence a invazivity je Pantonův-Valentinův leukocidin (PVL), dvousložkový, póry tvořící cytotoxin (vytváří póry v buněčné membráně některých leukocytů, což vede k lyzi těchto buněk), jehož gen je nesený na bakteriofágovém genomu, který se začlenil do genomu hostitelské bakterie. Zvýšené množství těchto PVL-produkujících kmenů zachycených ve světě v komunitě (prostředí tělocvičen, denní pečovatelská centra pro malé děti, vojenští branci, věznice, homosexuální společnosti, bezdomovci) je spojeno se závažnými nekrotizujícími kožními infekcemi, a navíc v některých zemích je až 70 % těchto kmenů navíc rezistentních k meticilinu (v ČR cca 6 %). Nekrózou doprovázené pneumonie, zejména u dětí, tvoří zcela nový syndrom s mortalitou až 40 %. V komunitě získané MRSA jsou dnes jedním z nejzávažnějších problémů a podle očekávání si také našly svou cestu do nemocnic, kde již byly zaznamenány drobné epidemie způsobené těmito kmeny.



## Analýza genomu

Většina genetických studií byla provedena u *S. aureus* vzhledem k jeho klinickému významu. Poměrně méně poznatků je dostupných u *S. epidermidis*. V devadesátých letech 20. století byl vyvinut nový genetický modelový systém u nepatogenního druhu *Staphylococcus carnosus*, který je používán jako startovací kultura v masném potravinářském průmyslu. Výzkumu genomu *S. carnosus* se detailně věnuje pracoviště prof. F. Götze na Univerzitě v Tübingenu, kde byly vyvinuty také klonovací vektorové systémy (plazmidy pro přípravu rekombinantních molekul DNA) umožňující studium stafylokokových genů a jejich přenosy do *Escherichia coli*. Studie klasické bakteriální genetiky se zabývaly u stafylokoků transformací (přenosy DNA do buňky, jejíž genetická informace se poté projeví fenotypově), transdukci (přenosy genů prostřednictvím bakteriofágů), charakterizací genetického základu rezistence k antibiotikům – zejména různých typů stafylokokových plazmidů a transpozonů.

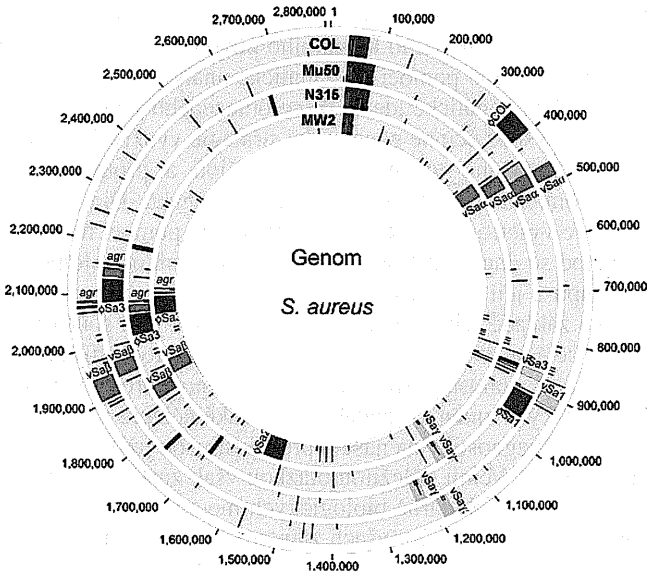
Několik nových experimentálních přístupů, mezi nimiž je nutno zdůraznit především pulzní gelovou elektroforézu pro dělení velkých molekul DNA, umožnilo začátkem 80. let mapovat megabázové úseky genomu. Před rokem 1995, než byla zveřejněna sekvence prvního bakteriálního genomu *Haemophilus influenzae*, bylo publikováno více než 90 fyzikálních map různých bakteriálních genomů, jejichž kompletní sekvence DNA je dnes již u většiny známa. Geneticky nejlépe charakterizovaným stafylokokovým kmenem je dnes *S. aureus* NCTC 8325, klinický izolát izolovaný před více než 45 lety. Fyzikální mapa genomu tohoto kmene, sestavená prostřednictvím technik pulzní gelové elektroforézy a Southernovy hybridizace s genově specifickými sondami (krátkými molekulami DNA značenými reportérskou značkou, umožňující lokalizaci genů), poskytla první informace o celkové struktuře genomu *S. aureus*. V současné éře výzkumu genomů je k dispozici kompletní anotace 13 stafylokokových genomů, zahrnující devět kmenů *S. aureus*, dva kmeny *S. epidermidis*, jeden kmen *S. saprophyticus* a jeden *S. haemolyticus*. To řadí stafylokoky na přední místo mezi nejlépe charakterizovanými mikroorganismy. Projekty sekvencování stafylokokových genomů poskytly obrovské množství dat, které vyžadují další zpracování s využitím přístupů funkční genomiky a proteomiky. Znalost sekvencí DNA umožňuje objasnit jak všeobecnou metabolickou organizaci buňky, tak vlastnosti genomu, které se vztahují k patogenitě a virulenci. Co se týká porozumění patogenitě, výzkumy odhalily až 70 nových pravděpodobných faktorů virulence, které je nutno ověřit laboratorním studiem. Srovnávací genomika přinesla nové poznatky o schopnosti organismů evoluce a adaptace. Genomické, proteomické a bioinformatické přístupy mohou být využity také pro vývoj antistafylokokových vakcín a nových antibiotik. Bezprostředním přínosem projektů sekvencování genomů je možnost konstrukce celé řady diagnostických DNA-čipů nové generace (velké množství specifických krátkých oligonukleotidů DNA imobilizovaných

na pevném podkladu pro hybridizační studie), zahrnujících geny identifikované při řešení všech stafylokokových genomových projektů. Tyto čipy se v blízké budoucnosti stanou základem pro studium evoluce, genetické variability a rozšíření variabilních genetických elementů u klinicky významných kmenů *S. aureus*.

Genom *S. aureus* tvoří kružnicový chromozom o velikosti 2,8 až 2,9 miliónu párů bází. Předpokládá se, že obsahuje přibližně 2 600 až 2 700 otevřených čtecích rámců (pravděpodobných genů). Přibližně 78 % těchto čtecích rámců kódujících tzv. provozní geny (zajišťující metabolismus buňky) plně odpovídá homologům nalezeným v příbuzných grampozitivních kokách s nízkým obsahem G+C rodu *Bacillus*. Vzájemné srovnání chromozomů *S. aureus* ukázalo, že jsou navzájem kolineární a obsahují shodné geny přítomné v konzervativním pořadí ve všech analyzovaných kmenech a kromě toho variabilní genetické elementy přítomné pouze u některých kmenů. Naopak 22 % genů je kmenově specifických a tak mohou hrát roli v adaptaci a specializaci. Ze srovnání podobnosti stěžejních sekvencí genomu u různých kmenů vyplývá, že v porovnání s jinými bakteriálními rody je *S. aureus* velmi klonální a geny podléhají rekombinaci až 15× méně často než mutacím. V současné době však bylo dokázáno, že prostřednictvím konjugativního přenosu může ojediněle docházet k rozsáhlým záměnám úseků genomu, které představují až 20 % jeho velikosti.

Variabilní složka genomu *S. aureus*, která představuje přibližně 20 až 25 % jeho sekvence DNA, se skládá z obvykle mobilních variabilních genetických elementů, které mohou být horizontálně přenášeny mezi kmeny. Tyto elementy zahrnují profágy (DNA bakteriálních virů začleněných do stafylokokového chromozomu), ostrovy patogenity (kratší elementy nesoucí geny kódující superantigeny jako enterotoxiny B a C a toxin syndromu toxického šoku TSST-1; jsou spojeny s enterotoxikózami potravin a syndromem toxického šoku), chromozomové kazety (mobilní elementy, které se integrují zpravidla do stejného místa na chromozomu poblíž počátku replikace prostřednictvím páru rekombinázových proteinů a nesou oblast genů odpovědnou za rezistenci k meticilinu; někteří autoři řadí tyto elementy mezi ekologické fitness-ostrovy), genomické ostrovy (genetické elementy podobné ostrovům patogenity, vyskytující se stabilně vždy ve dvou oblastech chromozomu; mohou navozovat rezistenci k antibiotikům nebo kódovat potenciální faktory patogenity), genomické ostrůvky (variabilní genetické elementy v porovnání s genomickými ostrovy mnohem menší a obvykle obsahující pouze jeden gen), transpozony (malé mobilní elementy nacházející se na různých místech stafylokokového genomu; svou inzercí do genů nebo jejich sousedství mohou způsobovat inaktivaci nebo modifikaci určitých buněčných funkcí; řada transpozonů může nést geny pro rezistenci k antibiotikům) a plazmidy (samostatné kružnicové molekuly DNA nesoucí geny pro rezistenci k antibiotikům, těžkým kovům nebo antiseptikům; mohou se také začlenit do chromozomu). Identifikace a podrob-

ná charakterizace těchto variabilních genetických elementů umožňuje lépe porozumět, jak *S. aureus* způsobuje onemocnění a jak probíhá jeho evoluce.



Srovnání sekvencí genomových DNA čtyř kmenů *Staphylococcus aureus* znázorňuje variabilitu v přítomnosti různých typů genetických elementů odpovídých za patogenitu a rezistenci k antibiotikům

## Molekulární diagnostika

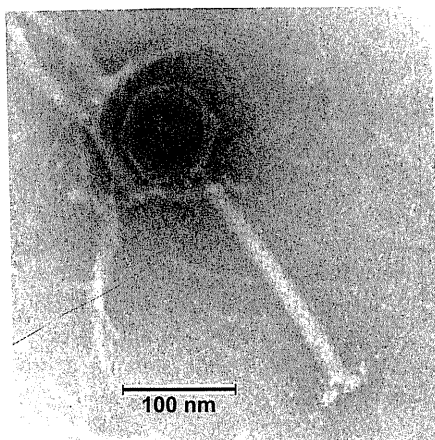
Právě molekulárně genetické metody se během posledních 15 let rozvinuly do řady aplikací pro identifikaci, diferenciaci a typizaci bakterií. V mnoha laboratořích jsou pro identifikaci sice stále využívány metody založené na fenotypových znacích jako morfologie, biochemické vlastnosti, sérologické vlastnosti, rezistence k antibiotikům, citlivost k bakteriofágům nebo chemické složení buněk, avšak metody založené na DNA jsou stále častěji předmětem zájmu. Cílem molekulární diagnostiky je jednak identifikace etiologických agens způsobujících onemocnění, což má význam v klinických oborech pro stanovení účinné léčby, prevence a vyhledání zdroje nebo původce choroby; a jednak účinná typizace a diferenciacie mikrobiálních izolátů, která je významná ze srovnávacího molekulárně epidemiologického hlediska („surveillance“), pro studium evoluce, taxonomie a ekologie.

Metody pro identifikaci stafylokoků založené na DNA obvykle využívají aplikací polymerázové řetězové reakce (PCR), případně sekvencování ampli-

fikovaných úseků DNA. Výsledkem většiny molekulárních typizačních metod je tzv. otisk DNA (DNA-fingerprint) představovaný např. vzorem restričních fragmentů genomové DNA, produktů PCR nebo hybridizujících úseků genomu rozdílné velikosti (plazmidového nebo chromozomálního původu), který je specifický pro izoláty určitého klonálního původu. Výsledné profily se dají vyhodnotit vizuálně nebo pomocí matematické analýzy s použitím výpočetní techniky. Za účelem genetické identifikace omezeného množství kmenů jsou dnes k dispozici vysoce účinné genomické strategie využívající rozsáhlé multilokusové sekvencování, technologie DNA-čipů a proteomické přístupy umožňující shromáždění mimořádného množství znaků. Diagnostika přítomnosti bakterie ve vyšetřovaném klinickém materiálu pomocí molekulárně biologických metod se dnes stává nezbytnou součástí mikrobiologických vyšetřovacích postupů a její pozitivní přínos je zřejmý. Pro typizaci a klasifikaci stafylokoků na základě jejich genetické rozmanitosti je v současné literatuře dobře popsána celá řada molekulárních typizačních metod a diskutována jejich reprodukovatelnost, stálost, rozlišovací síla, vhodnost pro monitorování určitých typů genetických změn a standardizace. Také některé nově vyvinuté metody molekulární diagnostiky na našem pracovišti jsou již zaváděny do klinické laboratorní praxe. Velmi důležitou otázkou však zůstává klinická interpretace výsledků řady molekulárně biologických metod a právě zde se jeví jako velmi přínosná úzká spolupráce všech zainteresovaných odborníků, tedy molekulárního biologa, klinického mikrobiologa a ošetřujícího lékaře.

## Perspektivy

Mikroorganismy představují obrovský rezervoár genetických zdrojů, který není zejména u koaguláza-negativních stafylokoků dostatečně charakterizován. Vzhledem k možnosti horizontálního mezidruhového přenosu některých genů, zejména pro faktory rezistence a virulence je nezbytné další studium evoluce genomů. Také u *S. aureus* existuje řada vlastností, jejichž molekulární podstata dosud není objasněna, např. znaky, které určují schopnost některých klonů stát se velmi rychle celosvětově rozšířenými. Zdá se, že to jsou znaky multifaktoriální, protože tento druh je obecně rozšířený v prostředí v důsledku jeho schopnosti přežít mimo hostitele a také protože jako komenzální bakterie kolonizuje sliznice lidského nosu. V molekulárně biologickém výzkumu stafylokoků je proto rozhodující odhalit klíčové parametry nezbytné pro virulenci a objasnit vznik epidemických klonů, a to vyžaduje detailní molekulárně biologické znalosti. Tento výzkum plně využívá současné přístupy bioinformatiky, genomiky a proteomiky. Také techniky molekulární diagnostiky stafylokoků jsou nezbytné pro jejich účinnou charakterizaci a identifikaci a neustále se rozvíjejí. Předpokladem schopnosti účinně diagnostikovat nebezpečné klony multirezistentních stafylokoků je znalost variabilní složky jejich genomu, která má podstatný podíl na jejich patogenitě. Přestože již byla dokončena celá řada projektů stafylokokových genomů, bude nutné identifi-



Polyvalentní stafylokokový bakteriofág  
je schopen účinně lyzovat  
až 95 % kmenů *S. aureus*

věnována vývoji nových diagnostických metod pro molekulární epidemiologii a taxonomii, molekulární analýze genetických determinant virulence, molekulární a genetické analýze stafylokokových virů (bakteriofágů) a jejich vlivu na patogenitu a evoluci stafylokoků. Navazující problematika řeší vztah mezi polyvalentními bakteriofágy vyznačujícími se širokým rozmezím hostitelů a kmeny rodu *Staphylococcus*. Cílem je využití bakteriofágů v diagnostice patogenních druhů stafylokoků a při léčbě stafylokokových infekcí.

kovat a charakterizovat další variabilní genetické elementy a studovat mechanismy horizontálního přenosu genů virulence a faktorů ovlivňujících regulaci jejich exprese.

V současné době se výzkumem stafylokoků na Přírodovědecké fakultě Masarykovy univerzity úspěšně zabývá pracoviště Laboratoře molekulární diagnostiky mikroorganismů vedené profesorem J. Doškařem, jehož vědecko-pedagogický kolektiv tvoří dále doc. R. Pantůček a doc. V. Růžičková. Laboratoř úzce spolupracuje s řadou tuzemských a zahraničních pracovišť. Její výzkumná práce je

## Redakci Universitas došlo

*pokračování ze str. 16*

**Česká ekonomika v procesu globalizace.** Změny právní úpravy a jejich dopady na ekonomiku. Sborník příspěvků z mezinárodní ekonomické konference 13. 9. – 14. 9. 2006. Masarykova univerzita Brno, 2006

**Česká ekonomika v procesu globalizace.** Kvantitativní metody a modely v ekonomii. Sborník příspěvků z mezinárodní ekonomické konference 13. 9. – 14. 9. 2006. Masarykova univerzita Brno, 2006

**Česká ekonomika v procesu globalizace.** Role a problémy veřejného sektoru v moderním sociálním státě. Sborník příspěvků z mezinárodní ekonomické konference 13. 9. – 14. 9. 2006. Masarykova univerzita Brno, 2006

**Česká ekonomika v procesu globalizace.** Manažer a jeho úloha pro úspěšnost podniku. Sborník příspěvků z mezinárodní ekonomické konference 13. 9. – 14. 9. 2006. Masarykova univerzita Brno, 2006

**Geologické výzkumy na Moravě a ve Slezsku v roce 2005.** XIII. ročník. Masarykova univerzita Brno, 2006

**Imaginaire du roman québécois contemporain.** Actes du colloque Université Masaryk de Brno, 11-15 mai 2005 sous la direction de Petr Kyloušek, Max Roy, Józef Kwaterko. Masarykova univerzita Brno, 2006

**K aktuálním otázkám oboru podnikového hospodářství.** Sborník referátů z konference. Brno, 2006