

Masarykova univerzita  
Přírodovědecká fakulta  
Ústav experimentální biologie  
Oddělení genetiky a molekulární biologie

**Molekulární typizace *Staphylococcus aureus* založená na detekci  
polymorfismů u profágů**

Diplomová práce

Ráda bych poděkovala především vedoucímu své diplomové práce doc. RNDr. Romanu Pantůčkovi, Ph.D., který mě mnohému naučil, se vším mi vždy poradil a věnoval mi mnoho času a úsilí. Mé poděkování patří také všem ostatním pracovníkům Laboratoře molekulární diagnostiky mikroorganismů, za jejich vydatnou pomoc a morální podporu.

<b>1. Úvod a problematika .....</b>	<b>1</b>
1.1. Taxonomie stafylokokových fágů .....	1
1.2. Původ a evoluce bičíkatých fágů .....	3
1.2.1. Původ bičíkatých fágů .....	3
1.2.2. Evoluce bičíkatých fágů .....	3
1.3. Genom mírných stafylokokových fágů .....	5
1.4. Přirozený význam mírných stafylokokových fágů .....	7
1.4.1. Lyzogenní konverze a virulence <i>Staphylococcus aureus</i> .....	7
1.4.2. Stafylokokové ostrovy patogenity .....	9
1.4.3. Vliv na genotyp hostitele .....	9
1.5. Typizace <i>Staphylococcus aureus</i> .....	10
1.5.1. Fenotypové metody .....	11
1.5.2. Genotypové metody .....	11
1.5.3. Profágová typizace .....	12
<b>2. Cíle diplomové práce .....</b>	<b>14</b>
<b>3. Materiál a metody .....</b>	<b>15</b>
3.1. Bakteriální kmeny a bakteriofágy .....	15
3.2. Izolace DNA .....	15
3.3. Restrikční štěpení .....	16
3.4. Elektroforéza .....	16
3.5. Příprava směsi fágových sond .....	16
3.5.1. Vyhledání fágových sekvencí k přípravě molekulárních sond .....	16
3.5.2. Vyhledání restrikčních míst ohraničujících sekvenci sondy .....	17
3.5.3. PCR fágových DNA .....	17
3.5.4. Klonování ve vektoru pBluescript II SK+ .....	18
3.5.5. Izolace štěpených fágových fragmentů a PCR produktů z agarózového gelu .....	18
3.5.6. Neradioaktivní značení izolovaných DNA .....	19
3.6. Pulzní gelová elektroforéza .....	19
3.6.1. Izolace bakteriální genomové DNA (k pulzní gelové elektroforéze) .....	19
3.6.2. Pulzní gelová elektroforéza .....	20

3.7. Hybridizace nukleových kyselin se směsí sond .....	20
3.7.1. Southernův přenos bakteriální a fágové DNA .....	20
3.7.2. Hybridizace bakteriální a fágové DNA se směsí sond .....	20
<b>4. Výsledky .....</b>	<b>21</b>
4.1. Vyhledání fágových sekvencí DNA k přípravě fágově specifických sond.....	21
4.2. Klonování sekvencí pro přípravu sond ve vektoru pBluescript II SK+ .....	21
4.3. Izolace naklonovaných fágových fragmentů z agarózového gelu .....	28
4.4. Příprava směsi sond a její ověření .....	30
4.5. Hybridizace makrorestrikčních spekter bakteriálních DNA se směsí sond .....	32
4.6. Výpočet typovatelnosti a rozlišovací síly .....	36
<b>5. Diskuze .....</b>	<b>39</b>
<b>6. Závěr .....</b>	<b>48</b>
<b>7. Summary .....</b>	<b>49</b>
<b>8. Literatura .....</b>	<b>50</b>

# 1. ÚVOD A PROBLEMATIKA

Stafylokokové fagy (stafylofagy) jsou viry infikující bakterie rodu *Staphylococcus aureus*. Jako vnitrobuněční parazité hrají důležitou roli v biologii stafylokoků. V průběhu lytického cyklu dochází k lyzi hostitelské buňky, při navození cyklu lyzogenního se stafylofagy stávají významnou součástí bakteriálního genomu.

## 1.1. Taxonomie stafylokokových fágů

Nejdále do historie sahá členění stafylokokových fágů do serologických skupin (BRANDIS a LENZ 1984). Tato klasifikace je založena na zjišťování a srovnávání antigenních vlastností fágových virionů. Nejčastěji užívanou metodou je neutralizace infekčních schopností fágů skupinou protilátek, její nevýhodou však je, že identifikuje pouze antigeny konce bičíku (ACKERMANN aj. 1992). V současné době jsou stafylofagy rozděleny do sedmi serologických skupin – A, B, C, F a L (čeleď *Siphoviridae*), D (čeleď *Myoviridae*) a G (čeleď *Podoviridae*) (tabulka 1).

Členění do morfologických skupin se poprvé objevuje v 60. letech 20. století v souvislosti s rozvojem elektronové mikroskopie. Využívána je především metoda negativního kontrastování a posuzuje se velikost, tvar a struktura fágové hlavy a bičíku (BRANDIS a LENZ 1984, ACKERMANN 2001). Stafylofagy se dělí do tří morfologických skupin: A1 (čeleď *Myoviridae*), B1 a B2 (čeleď *Siphoviridae*) a C1 (čeleď *Podoviridae*). Poněkud problematické je srovnání nejpočetnější čeledi *Siphoviridae*, která je variabilní v rámci fágových druhů a serologických skupin, avšak zahrnuje pouze dvě morfologické skupiny. Všichni její zástupci se totiž vyznačují poměrně dlouhými nekontraktilními bičíky, proto je při jejich klasifikaci významným kritériem pouze tvar hlavy (ACKERMANN aj. 1992).

V současnosti je běžně užívána klasifikace ustanovená Mezinárodní komisí pro taxonomii virů (ICTV), založená na členění fágů do řádů, čeledí a druhů (na rozdělení do rodů se pracuje). Všechny stafylofagy patří do řádu *Caudovirales*, který zahrnuje bičíkaté, ds DNA fagy. Tento řád je rozdělen do tří čeledí, kde klasifikačním kritériem je morfologie bičíku: *Siphoviridae* (dlouhé, nekontraktilní bičíky), *Myoviridae* (kontraktilní bičíky) a *Podoviridae* (krátké, nekontraktilní bičíky) (MANILOFF a ACKERMANN 1998). Definice druhu je založena na polytetickém konceptu. Druh je zde pojímán jako skupina (kmen, či několik kmenů) definovaná souborem určitých znaků, jednotlivý příslušník však nemusí nést všechny

tyto znaky. Kritérii pro klasifikaci stafylofágů do těchto druhů jsou vlastnosti virionu (zahrnuje mimo jiné také kritéria morfologická a serologická), vlastnosti genomu (např. velikost, sekvenční homologie, struktura genomu, RFLP vzory) a vlastnosti fyziologické (např. rozmezí hostitele, virulentní či mírná povaha infekce, schopnost transdukce a lyzogenní konverze) (ACKERMANN aj. 1992). Jednotlivé druhy jsou pojmenovány podle jejich typického představitele ( $\phi$ TWORT čeledě *Myoviridae*,  $\phi$ 2848A,  $\phi$ 77,  $\phi$ 107,  $\phi$ 187,  $\phi$ 11,  $\phi$ 3A čeledě *Siphoviridae*,  $\phi$ 44AHJD čeledě *Podoviridae*) (tabulka 1).

ICTV taxonomie bakteriofágů však byla v poslední době podrobena kritice. Zásadním argumentem proti užívanému hierarchickému přístupu je mozaikovitý charakter fágových genomů. Ten je důsledkem intenzivního horizontálního přenosu genů (modulů) mezi fágy (viz kapitola 1.2.). Proto Lawrence aj. (2002) navrhuje systém s vlastnostmi sítě, založený na existenci jednotek nazývaných mody. Modus představuje skupinu fágů, které sdílí konkrétní genetický modul nebo fenotypovou vlastnost. Každý fág je pak charakterizován souborem modů, do kterých náleží. Čím si je dvojice fágů příbuznější, tím více modů spolu sdílí. Rohwer a Edwards (2002) navrhuje hierarchický systém, založený na hodnocení počtu genů, které jsou dvojicím fágů společné.

**Tab. 1.** Taxonomie stafylokokových fágů podle Ackermann a DuBow 1987

Fágový druh	Čeďed'	Fágy (fágové kmeny)	Morfolog. skupina	Serolog. skupina
TWORT	<i>Myoviridae</i>	TWORT, 131, 812, SK311, U16, Ph1-Ph9, Sb-1	A1	D
2848A	<i>Siphoviridae</i>	2848A, 2792A	B1	
77	<i>Siphoviridae</i>	$\Phi$ 13, 42D, 77, 84	B1	F
107	<i>Siphoviridae</i>	88A, 107	B1	C
187	<i>Siphoviridae</i>	187	B1	L
11	<i>Siphoviridae</i>	$\Phi$ 11, 29, 44A, 52, 52A, 53, L54A, 55, 71, 79, 80, 80 $\alpha$ , 83A, 85	B1	B
3A	<i>Siphoviridae</i>	3A, 3B, 3C, 6, 7, $\Phi$ 12, 16, 42E, 47, 54, 73, 75, 81, 94	B2	A
44AHJD	<i>Podoviridae</i>	44AHJD, stc1, stc2	C1	G

## **1.2. Původ a evoluce bičíkatých fágů**

### **1.2.1. Původ bičíkatých fágů**

Mnoho autorů se shoduje v přesvědčení, že bičíkaté fágy tvoří starobylou, monofyletickou skupinu (HENDRIX 1999, 2002, IANDOLO aj. 2002, DESIERE aj. 1999). Jejich společný původ již sice nelze vysledovat na úrovni sekvence nukleotidů ani aminokyselin, lze jej však stále odhalit v trojrozměrné struktuře proteinů kapsidu a bičíku, v replikační strategii a struktuře genomu (ACKERMANN 1998). Otázkou však stále zůstává přesné evoluční stáří této skupiny. Podle některých odhadů jsou bičíkaté fágy stejně staré jako jejich bakteriální hostitelé. Hendrix (1999) považuje za možné, že jejich původ sahá do dob před divergencí prokaryot, eukaryot a archeí, a že s některými viry eukaryot a archeí mohou mít tyto fágy společného předka.

Mechanismus vzniku bičíkatých fágů je rovněž nejasný. Je možné, že vznikly zjednodušením primitivních buněčných organismů, které se postupně staly závislé na moderních životních formách. Může se však také jednat o seskupení sobeckých genů, které se oddělily z buněčných genomů a staly se nezávislé na buněčné kontrole (BRUSSOW aj. 2004). Chimérický původ bičíkatých fágů naznačují homologie některých důležitých fágových lokusů s bakteriálními chromozomy (např. lytické enzymy) nebo transpozony (rekombinázy) (LOESSNER aj. 1997, ACKERMANN 1998). Hendrix aj. (2003) navrhli hypotézu, podle které byla počátečním krokem vzniku bakteriofágů mutace v bakteriálním genu. Mutantní protein získal schopnost samouspořádání do podoby proto-kapsidu, do kterého byl tento gen (stejně jako i jiné geny) náhodně sbalován a přenášen mezi buňkami. Postupem času se vedle kapsidového genu začleňovaly další geny (chromozomového, transpozonového či plazmidového původu), přinášející celému seskupení selekční výhody (například selektivní sbalování nebo replikace tohoto proto-genomu). Každý začleněný gen dále podléhal evoluci vertikální.

### **1.2.2. Evoluce bičíkatých fágů**

V evoluci bičíkatých fágů se uplatňují dva základní principy. Prvním je vertikální přenos genů a s ním spojená akumulace bodových mutací a genomových přestaveb. Druhým je horizontální přenos genů, jehož prostřednictvím jsou rekombinací vyměňovány geny mezi fágy, ale také získávány geny nové (HENDRIX 2002).

Horizontální přenos genů mezi fágovými genomy je podstatou modulární teorie (BOTSTEIN 1980), podle které není základní jednotkou evoluce daný virus sám o sobě, nýbrž skupina vyměnitelných genetických elementů - modulů. Každý modul představuje určité seskupení genů a může být považován za funkční jednotku. Homologní funkce u různých fágů mohou být zajišťovány moduly, které postrádají jakoukoli sekvenční homologii. Výměna daného modulu za jiný probíhá rekombinací mezi fágy, které tvoří společnou, vzájemně se křížící populaci. Rekombinaci zajišťují ty oblasti fágových genomů, které jsou si navzájem homologické, nazývané linkery.

Tato teorie se snažila vysvětlit jev pozorovaný u lambdoidních fágů. Pořadí modulů ve fágových genomech je totiž velmi konzervativní a genom určitého fága se jeví jako mozaika poskládaná z genomů (modulů) jiných fágů. V současnosti je modulární teorie rozšířena o několik aspektů: 1. Globální populace fágů tvoří společný genofond, pravděpodobnost získání jedné konkrétní sekvence se však může pro různé fágy výrazně lišit. Například mezi heteroimunními fágy, infikujícími stejného hostitele, probíhá přenos sekvencí přímo a s vysokou intenzitou. Naproti tomu přenos sekvence mezi fágy s výrazně odlišnými ekologickými nároky probíhá pomalu a nepřímou, sérií mnoha postupných kroků (HENDRIX aj. 1999). 2. Jako modul nefiguruje pouze funkční seskupení genů, ve velké míře jde také o jednotlivé geny případně i o proteinové domény. 3. Není zcela jasné jaké mechanismy zajišťují horizontální přenos genů. Je však pravděpodobné, že se jedná o kombinaci homologní, místně specifické a nehomologní rekombinace (BRUSSOW aj. 2004). Nehomologní rekombinace probíhá mezi libovolnými úseky genomů, takže výsledkem jsou samozřejmě převážně nefunkční fágy s porušenými čtecími rámci nebo s genomy neadekvátních velikostí. Ty však podléhají selekci a v populaci přetrvávají pouze ty fágy, u kterých rekombinace neporušila funkční jednotky genomů (HENDRIX 2002).

Potenciálním zdrojem nových genů, které mohou bakteriofágy získávat horizontálním přenosem jsou chromozomy hostitelů, plazmidy a transpozony (CAMPBELL 1988). Pro geny, které byly získány relativně nedávno z vnějšího zdroje se užívá označení morony. Jejich cizorodý původ indikuje to, že na daném místě genomu obvykle chybí u blízce příbuzných fágů, mají jiné zastoupení bazí než okolní geny, případně jsou známy jejich homology na bakteriálních chromozomech (JUHALA aj. 2000, LAWRENCE 1999). Jsou charakteristické tím, že přinášejí fágu selekční výhodu, jelikož zvyšují fitness bakteriálního hostitele, v jehož chromozomu jsou jako součást profága přítomny. Obvykle se skládají z krátké kódující oblasti, promotoru a terminátoru transkripce (HENDRIX aj. 2003). To znamená, že mohou být transkribovány i v genomu profága, který je pod kontrolou imunitního represoru



(SUMBY a WALDOR 2003). Mechanismus jejich přenosu není známý, nejedná se však specifickou transdukci, při které jsou přenášeny výhradně geny nacházející se na chromozomu vedle místa začlenění profága (HENDRIX 2002). Typickými morony stafylofágů jsou geny kódující stafylokokové toxiny, o nich více v kapitole 1.4.

Výše uvedené modely vzniku a evoluce bičíkatých fágů byly formulovány převážně na poznacích genetiky a biologie lamdoidních fágů, fágů mykobakterií a fágů bakterií mléčného kvašení. Přesto je důvodné předpokládat, že se vztahují i na stafylokokové fagy, které s těmito skupinami sdílí podstatné charakteristiky, jako je modulární, mozaikovitá struktura genomu, horizontální přenos genů nebo přítomnost moronů (KWAN aj. 2005).

### 1.3. Genom mírných stafylokokových fágů

Genomy stafylofágů čeledi *Siphoviradae* jsou tvořeny dvouřetězcovou DNA. Jejich velikost se pohybuje v rozmezí 39,6 až 45,6 kb (IANDOLO aj. 2002, KANEKO aj. 1998, KWAN aj. 2005, NARITA aj. 2001, YAMAGUCHI aj. 2000, ZOU aj. 2000). Průměrné zastoupení otevřených čtecích rámců je asi 93 %, genová hustota 1,7 genů na kb a obsah G+C asi 35 %. Většina genů je přepisována pouze z jednoho vlákna, některé malé shluky genů však mohou být přepisovány i z vlákna opačného (KWAN aj. 2005).

Geny stafylofágů jsou uspořádány do funkčních jednotek – modulů. Pro genomy mírných stafylofágů je typické konzervativní pořadí modulů: [lyzogenie – replikace DNA – sbalování DNA – hlava – bičík – vlákna bičíku – lyze] (BRUSSOW a DESIERE 2001, IANDOLO aj. 2002, KWAN aj. 2005).

**Modul lyzogenie** je charakteristický uspořádáním genů [integráza (*int*) - excize (*xis* nebo *OrfC*) - gen pro represor podobný genu *cl* - gen pro represor podobný genu *cro* - gen pro antirepresor podobný genu *cII*] (IANDOLO aj. 2002, LUCCHINI aj. 1999). Enzym integráza náleží do rodiny rekombináz a je zodpovědná za místně specifickou rekombinaci, která probíhá při integraci nebo excizi fága z hostitelského chromozomu. Transkripce genu *int* je regulována proteiny RinA a nebo RinB, které se vážou na regulační sekvenci, sousedící s tímto genem proti směru transkripce (YE a LEE 1993). Integráza je vysoce konzervativní mezi mnoha fágovými druhy, homologie je nejvíce patrná v aminokyselinové sekvenci C-konce proteinu (ARGOS aj. 1986, YE a LEE 1989). Gen *xis* kóduje enzym excizionázu, která umožňuje správnou funkci integrázy při excizi profága. V mnoha případech se na místě genu *xis*, který kóduje enzym excizionázu, nachází homolog genu *OrfC* (CARROLL aj. 1995).

Předpokládá se, že tento gen, ač velice málo homologický s *xis*, plní podobnou funkci avšak tato domněnka však dosud nebyla potvrzena (IANDOLO aj. 2002).

**Modul replikace DNA** obsahuje homology genů kódující například DNA polymerázu, protein vázající se na jednořetězcovou DNA, helikázu, DnaC-protein nebo dUTPázu, avšak mnoho ostatních genů má zatím neznámou funkci (IANDOLO aj. 2002, KANEKO aj. 1998, KWAN aj. 2005, NARITA aj. 2001, YAMAGUCHI aj. 2000, ZOU aj. 2000). Tento modul se z jedné strany překrývá s modulem lyzogenie, z druhé strany na něj navazuje oblast, která bývá někdy vydělována jako samostatný modul regulace transkripce. V této oblasti byly identifikovány geny *rinA* a *rinB*, které regulují transkripci genu *int* (YE a LEE 1993). U některých fágů jsou přítomny oba tyto geny (IANDOLO aj. 2002, KWAN aj. 2005) u jiných pouze jeden z nich (NARITA aj. 2001, KANEKO aj. 1998, YAMAGUCHI aj. 2000).

**Modul sbalování DNA** obsahuje dva dosud identifikované geny. Kódují velkou a malou podjednotku terminázy, enzymu, který štěpí DNA konkatemer v průběhu sbalování (IANDOLO aj. 2002, KANEKO aj. 1998, KWAN aj. 2005, NARITA aj. 2001, YAMAGUCHI aj. 2000, ZOU aj. 2000). Fágy s *cos* sbalovacím mechanismem kódují pouze velkou podjednotku, zatímco fágy s *pac* mechanismem obsahují oba tyto geny (IANDOLO aj. 2002, LE MARREC aj. 1997).

**Moduly hlavy, bičíku a vláken bičíku** jsou, co se týče zastoupení a pořadí jednotlivých genů, zřejmě nejkonzervativnějšími moduly vůbec, podobně jako u ostatních modulů však stále obsahují mnoho neidentifikovaných genů (DESIERE aj. 1999). Kwan aj. (2005) rozdělili jimi osekvenované genomy mírných stafylofágů podle struktury modulu hlavy do tří hlavních skupin, z nichž nejpočetnější je: [portálový protein – morfogeneze hlavy – vedlejší kapsidový protein – hlavní kapsidový protein – morfogeneze hlavy]. Dalšími identifikovanými geny jsou například geny pro hlavní bičíkový protein, vedlejší bičíkový protein, protein určující délku bičíku nebo protein vláken bičíku (IANDOLO aj. 2002, KANEKO aj. 1998, KWAN aj. 2005, NARITA aj. 2001, YAMAGUCHI aj. 2000, ZOU aj. 2000).

**Lytický modul** obsahuje geny *hol* a *ply*, jejichž produkty, holiny a endolysiny, tvoří dvousložkový lytický systém bakteriofágů. Holiny představují velmi různorodou skupinu hydrofobních membránových proteinů, dosud bylo objeveno více než 15 ortologních podskupin těchto proteinů u fágů gram-pozitivních bakterií (YOUNG aj. 2000). Na začátku lyze hostitelské buňky vytváří holin póry v buněčné membráně a umožňuje tak přístup druhého enzymu, endolysinu, k buněčné stěně. Endolysin rozkládá peptidoglykany buněčné stěny hydrolýzou glykosidických nebo amidových vazeb (YOUNG a BLÄSI 1995). V genomech mírných stafylofágů je obvykle přítomen jeden *hol* gen a jeden nebo dva geny pro

endolysiny rodiny amidáz (IANDOLO aj. 2002, KANEKO aj. 1998, KWAN aj. 2005, NARITA aj. 2001, YAMAGUCHI aj. 2000, ZOU aj. 2000). Za zmínku stojí gen *hol187* bakteriofága  $\phi 187$ , který je zvláštní tím, že se celá jeho sekvence nachází v genu pro endolysin, kde je odlišen jiným čtecím rámcem. Takové uspořádání je velice vzácné u biologických systémů, které obsahují genetický materiál v podobě dvoušroubovice DNA (LOESSNER aj. 1999).

**Fágové připojovací místo  $att_P$**  je nezbytné k začlenění fága do hostitelského chromozomu. Působením integrázy probíhá rekombinace s homologickou sekvencí v bakteriálním geonomu, připojovacím místem  $att_B$ . Po začlenění pak z těchto míst vznikají  $att_R$  a  $att_L$  místa, která ohraničují sekvenci profága (CAMPBELL 1992).

***cos* a *pac* místa** jsou sekvence, podle kterých rozlišujeme fágy s *cos* a *pac* sbalovacím mechanismem. Při sbalování prvně zmíněných se konkatemer DNA štěpí v *cos* místech a vznikají tak genomy jednotkové délky ohraničené kohezními konci. Naproti tomu konkatemer obsahující *pac* místa nemusí být vždy štěpen přímo v těchto místech. Výsledkem jsou cyklicky permutované genomy s koncovými redundancemi (BLACK 1988).

## 1.4. Přirozený význam mírných stafylokokových fágů

### 1.4.1. Lyzogenní konverze a virulence *Staphylococcus aureus*

Začlenění bakteriofága do chromozomu hostitelské bakterie se v některých případech projevuje lyzogenní konverzí. Lyzogenní konverze je změna fenotypu bakterie k tvorbě nebo naopak k inhibici tvorby určitého faktoru virulence. Podle toho rozlišujeme pozitivní a negativní lyzogenní konverzi (MATTHEWS a NOVICK 2005).

K **negativní lyzogenní konverzi** dochází v případě, kdy  $att_B$  užívané fágem, leží v kódující oblasti genu pro faktor virulence. Po začlenění fága dochází k inzerční inaktivaci tohoto genu (LEE a IANDOLO 1986). Na rozdíl od pozitivní lyzogenní konverze jsou dosud známy pouze dva faktory virulence druhu *S. aureus*, které podléhají negativní lyzogenní konverzi. Jde o  $\beta$ -hemolysin (*hly*) (COLEMAN aj. 1989, CARROLL aj. 1995) a lipázu (*geh*) (LEE a IANDOLO 1986). Negativně konvertující fágy by měly logicky snižovat fitness hostitele. Ve všech dosud známých případech však tyto fágy zároveň způsobují pozitivní konverzi pro jeden až čtyři jiné faktory virulence, proto zřejmě převažuje selekční zvýhodnění.

**Pozitivní lyzogenní konverze** je způsobena vnesením nového genu pro faktor virulence do hostitelského chromozomu. To se děje prostřednictvím profága, jehož je tento gen součástí (BETLEY a MEKALANOS 1985). Existuje široké spektrum faktorů virulence, jejichž geny jsou přítomny v genomech profágů. Příkladem jsou stafylokokové enterotoxiny (*se*) a exfoliativní toxin A (*eta*) které, kromě jiného, vykazují také superantigenní vlastnosti. Cytotoxické účinky má dvousložkový toxin Pantonův-Valentinův leukocidin (*lukS-PV-lukF-PV*). Významnou skupinu tvoří modulátory imunitní odpovědi lidského hostitele, mezi které patří stafylokokový inhibitor komplementu (*scn*) a chemotaxi inhibující protein (*chp*). Do této skupiny patří i exoenzym stafylokináza (*sak*), která také působí jako účinný aktivátor plasminogenu.

**Geny pro faktory virulence** jsou u stafylofágů nejčastěji přítomny v modulu lyze, obvykle mezi genem pro endolysin a *att<sub>R</sub>* místem. Jde například o geny *lukS-PV-lukF-PV* (KANEKO aj. 1998, NARITA aj. 2001), *eta* (YAMAGUCHI aj. 2000) a *sak* (SUMBY a WALDOR 2003). S modulem lyze je spojována také IEC oblast, která obsahuje geny, významně ovlivňující imunitní odpověď hostitele: [*sea/sep-sak-chp-scn*]. IEC oblast je přítomna v genomech *hly* negativně konvertujících fágů, které jsou však, právě díky přítomnosti IEC genů, zároveň až čtyřnásobně pozitivně konvertující. Zajímavé je neobvykle vysoké zastoupení tohoto typu fágů mezi stafylofágy z nemocničních kmenů *S. aureus* (VAN WAMEL aj. 2006).

Dalším místem, kde byla zjištěna přítomnost genů virulence (*seg2*, *sek2*) je modul lyzogenie, kde se nachází jako součást operonu [*cI*, *seg2*, *sek2*, *int*] (SUMBY a WALDOR 2003, BABA aj. 2002).

**Transkripce genů** pro faktory virulence (moronů), probíhá i u profágů, které jsou pod kontrolou imunitního represoru (viz kapitola 1.2.2.). Zajímavé však je, že parametry transkripce se mohou lišit u lyzogenních bakterií oproti bakteriím, u kterých byla navozena indukce profága. Příkladem je dramatické zvýšení transkripce genů *sak* a *sea* po indukci profága mitomycinem C. Tento jev lze vysvětlit replikací indukovaného fága, která má za následek zvýšení počtu kopií *sak* a *sea* genů. Rozdíly však byly prokázány také na úrovni kvalitativní. U lyzogenních bakterií probíhá transkripce každého z těchto genů nezávisle z vlastního promotoru. Po indukci však vznikají i delší transkripty, prepisované z jinak latentních fágových promotorů. Jedním z příkladů je promotor holinového genu, který je aktivován při navození lytického cyklu indukci (SUMBY a WALDOR 2003). Přestože v některých případech není jasné, zda zvýšení transkripce vede také ke zvýšení exprese faktoru virulence, například u genu *sak* byla zvýšená exprese jasně prokázána. Z toho

vyplývá, že látky, které vedou k indukci profágů, mohou představovat riziko u pacientů s infekcí *S. aureus*. V této souvislosti je zajímavé zjištění, že některá běžně užívaná antibiotika prokazatelně vyvolávají indukci profágů, následovanou zvýšením exprese faktoru virulence (GOERKE aj. 2006).

#### 1.4.2. Stafylokokové ostrovy patogenity

Stafylokokové ostrovy patogenity (SaPIs, *Staphylococcus aureus* pathogenicity islands) jsou poměrně velké chromozomální oblasti (15 - 18 kb), které patří mezi přídavné genetické elementy, do skupiny genomových ostrovů. Podobně jako bakteriofágy, kódují tyto elementy faktory virulence a tím významně ovlivňují patogenitu kmenů *S. aureus*. Toxinem specifickým právě pro SaPIs je toxin syndromu toxického šoku (*tst-1*), dále jsou to některé stafylokokové enterotoxiny nebo proteiny podobné exotoxinům (*set*) (BABA aj. 2002, YARWOOD aj. 2002).

Původ SaPIs je odvozen od bakteriofágů. Dokazuje to řada sekvencí předpokládaného bakteriofágového původu, například gen *int*, gen pro malou podjednotku terminázy nebo geny pro proteiny podobný *cro* a *cI* represorům (NOVICK aj. 2001, YARWOOD aj. 2002). V současné době byl popsán i genom bakteriofága vysoce homologický se SaPIs (KWAN aj. 2005).

SaPIs jsou pravděpodobně mobilní elementy. Kódují funkční integrázu a jsou ohraničeny přímými repeticemi, které zřejmě představují připojovací místa *att<sub>L</sub>*, *att<sub>R</sub>*, vzniklá při začleňování elementu do chromozomu. Zdá se však, že SaPIs nejsou schopny samostatné excize, replikace a enkapsidace. Podobně jako defektní profágy, vyžadují zřejmě ostrovy patogenity k uskutečnění těchto funkcí pomocného fága. Takový jev byl skutečně pozorován u SaPII, kde jako pomocný fág figuruje  $\phi 80\alpha$  (LINDSAY aj. 1998, RUZIN aj. 2001).

#### 1.4.3. Vliv na genotyp hostitele

Mírné stafylofágy zásadním způsobem ovlivňují genotyp hostitele, jelikož jsou v podobě profágů součástí jeho genomu. Toto tvrzení nabývá na důležitosti, přihlídneme-li k faktu, že naprostá většina kmenů *S. aureus* je lyzogenních nebo polylyzogenních (PANTŮČEK aj. 2004). Při srovnávání některých kmenů dokonce vyšlo najevo, že je to právě rozdíl v přítomnosti profágů, který je hlavní příčinou jejich odlišnosti (BRUSSOW aj. 2004).

Zdá se, že profágy hrají důležitou roli v dynamice bakteriálních genomů. Příbuzné nebo duplikované profágy představují homologická místa v genomu bakterie. Mezi nimi může

docházet k rekombinačním událostem, které vedou ke strukturálním genomovým přestavbám (BRUSSOW aj. 2004).

Stafylofágy dále figurují jako důležité prostředky horizontálního přenosu genů mezi stafylokoky. Mechanismem transdukce mohou přenášet chromozomovou DNA, plazmidy (NOVICK aj. 1986) a zřejmě také SCC*mec* genomové ostrovy, nesoucí geny pro rezistenci k antibiotikům (NOVICK aj. 2001). Zajímavým jevem, specifickým pro druh *S. aureus* je fágem zprostředkovaná konjugace, která se rovněž podílí na horizontálním přenosu genů mezi stafylokoky (LACEY 1980).

## 1.5. Typizace *Staphylococcus aureus*

*Staphylococcus aureus* je významným bakteriálním patogenem jak pro člověka, tak pro zvířata, u kterých způsobuje řadu invazivních onemocnění a toxikóz. V poslední době představuje závažný problém výskyt a šíření kmenů multiresistentních k antibiotikům, příkladem jsou meticilin resistantní kmeny *S. aureus* (MRSA).

Cílem typizace *S. aureus* je odlišení bakteriálních kmenů (klonů) různého původu. To má význam především z hlediska epidemiologického, kdy zjišťujeme, zda jsou bakteriální klony způsobující nákazu identické a mohly by tedy pocházet z jednoho zdroje (ŠTĚPÁN aj. 2004).

Metody typizace rozdělujeme podle charakteru typizačních znaků (markerů) na metody fenotypové a genotypové. Obě tyto skupiny zahrnují široké spektrum metod, které lze hodnotit a srovnávat na základě posuzování sedmi hlavní kritérií (tabulka 2).

**Tab. 2.** Kritéria k posuzování typizační metody podle MASLOW a MULLIGAN 1996, STRUELENS 1996

Typovatelnost	<ul style="list-style-type: none"> <li>• podíl izolátů které mohou být pomocí metody otypovány (= podíl izolátů, které nesou daný typizační marker)</li> </ul>
Reprodukovatelnost	<ul style="list-style-type: none"> <li>• schopnost metody klasifikovat izolát jak stejný kmen (typ) i po opakovaném testování</li> </ul>
Stabilita	<ul style="list-style-type: none"> <li>• schopnost typizačních markerů zůstat neměnnými i v následujících, klonálně odvozených, generacích</li> </ul>
Rozlišovací síla	<ul style="list-style-type: none"> <li>• průměrná pravděpodobnost, že bakterie s odlišnými genotypy budou klasifikovány jako odlišné kmeny (typy)</li> <li>• odráží polymorfnost typizačního markeru</li> <li>• k výpočtu se užívá Simpsonův index diverzity</li> </ul>
Epidemiologická shoda	<ul style="list-style-type: none"> <li>• schopnost metody klasifikovat jako stejný kmen všechny izoláty, které pocházejí z jednoho zdroje nákazy</li> </ul>
Jednoduchost provedení a interpretace	<ul style="list-style-type: none"> <li>• zásadní kritéria pro využití metody v klinické praxi</li> </ul>

### 1.5.1. Fenotypové metody

Existuje celá řada typizačních metod, založených na hodnocení fenotypových znaků *S. aureus*. V klinické praxi je běžné například testování bakterií na resistenci k antibiotikům nebo testování biochemických vlastností. Tradiční typizační metodou, která využívá různé citlivosti kmenů *S. aureus* k bakteriofágům, je fagotypizace (ŠTĚPÁN aj. 2004).

Fagotypizace se provádí pomocí 23 bakteriofágů, které tvoří Mezinárodní základní řadu pro typizaci lidských kmenů *S. aureus*. Fágy se dělí do pěti lytických skupin a zahrnují serologické skupiny A, B a F. Testovaný kmen je postupně infikován fágy základní řady a pro každého fága se hodnotí stupeň bakteriální lyze, kterou vyvolává. Soubor všech výsledků pro daný kmen charakterizuje jeho fagotyp (HÁJEK 1983). Kmeny se změněným fagotypem mohou vznikat přirozeně, v důsledku jejich lyzogenizace jedním či více fágy (COMTOIS 1960). Hlavní nevýhodou této metody je její technická a časová náročnost (WELLER 2000).

### 1.5.2. Genotypové metody

V současné době se do popředí zájmu dostávají metody genotypové, které mají oproti fenotypovým metodám řadu výhod. Jsou časově méně náročné, jelikož k jejich provedení obvykle není nutná laboratorní kultivace. Genotypové znaky jsou stabilnější než znaky fenotypové a nejsou závislé na expresi genů, která může být za podmínek laboratorní kultivace odlišná. Většina genotypových metod je použitelná pro všechny kmeny *S. aureus*, zatímco metody fenotypové jsou omezené počtem kmenů, které daný znak exprimují. U genotypových metod je obvyklá vyšší rozlišovací síla.

Genotypové metody můžeme rozlišit na metody přímé a nepřímé. Přímé metody zahrnují sekvenování a jeho modifikace, naproti tomu nepřímé metody nevyžadují stanovení DNA sekvence. Jejich podstatou je sledování polymorfности určitého genotypového znaku (markeru). Jako marker lze použít gen (*16S* rRNA, *nuc*, *agr*), negenovou oblast (*dru* přímá repetice), mobilní element (IS256, Tn554) nebo restriční místo. Výsledkem je fingerprint charakterizující daný kmen (ŠTĚPÁN aj. 2004, TENOVER aj. 1994). Podle způsobu provedení lze nepřímé genotypové metody členit do tří níže uvedených skupin.

**PCR a její modifikace.** PCR představuje rychlou a technicky poměrně snadno zvládnutelnou metodu, proto je výhodné její využití v klinické praxi. PCR lze aplikovat na široké spektrum markerů a existuje řada nejrůznějších modifikací této metody. Příkladem je PCR s náhodnými primery (AP-PCR, RAPD). RAPD má vysokou rozlišovací sílu a výhodou je také to, že není nutné znát DNA sekvenci k navržení PCR primerů. Na druhou stranu jsou u

RAPD časté problémy s reprodukovatelností a s interpretací výsledků (WELSH a MCCLELLAND 1990, VAN BELKUM aj. 1995).

Užití PCR je omezeno tím, že její pomocí nelze rozlišit lokusy se stejnou délkou, ale odlišnou sekvencí. Tento problém řeší denaturační gradientová gelová elektroforéza (DDGE). Podstatou DDGE je rozdílná pohyblivost sekvenčně odlišných produktů v polyakrylamidovém gelu s gradientem denaturačního činidla (GURTNER aj. 2001).

**Restrikční analýza.** Restrikční analýza je metoda založená na detekci polymorfismu v délce restrikčních fragmentů (RFLP). Nejužívanější z této skupiny metod je makrorestrikční analýza po pulzní gelové elektroforéze (PFGE) (PANTŮČEK aj. 1996). Až na výjimky má PFGE stejně vysokou nebo vyšší rozlišovací sílu jako ostatní metody (MASLOW a MULLIGAN 1996) a velmi vysokou reprodukovatelnost (TENOVER aj. 1997). Nevýhodou PFGE jsou časové a technické nároky.

Restrikční analýze může být, kromě chromozomální DNA, podrobena také DNA plazmidová (REAP) (TENOVER aj. 1994). Doplnující metodou je agarózová elektroforéza neštěpených plazmidů, při které se zjišťuje počet a velikost plazmidů neboli plazmidový profil daného kmene (ETIENNE aj. 1990).

**Metody využívající DNA-DNA hybridizaci.** K detekci RFLP lze využít selektivní hybridizace restrikčních fragmentů se značenou sondou nebo směsí sond. Jde tedy o kombinaci dvou markerů, kde prvním je přítomnost a poloha restrikčního místa a druhým je libovolný marker, ke kterému sonda hybridizuje (KREISWIRTH aj. 1995, TENOVER aj. 1994).

Binární typizace je založená na hybridizaci genomové DNA se směsí sond, které se připravují značením RAPD produktů. K přípravě sond jsou vybrány ty PCR produkty, které byly při vizuálním hodnocení fingerprintů zodpovědné za rozdíly mezi kmeny. Výhodou binární typizace je její rozlišovací síla, která je vyšší než rozlišovací síla makrorestrikční analýzy (VAN LEEUWEN aj. 1999, 2001).

### 1.5.3. Profágová typizace

Profágová typizace patří mezi nepřímé genotypové metody. Jde o metodu novou, která se dosud k typizaci stafylokoků nepoužívá. Podobně jako fagotypizace využívá profágová typizace k rozlišování kmenů *S. aureus* stafylokokových fágů. Typizačním markerem zde však není rozdílná citlivost kmenů k fágové infekci, nýbrž přítomnost profágů v genomu stafylokoků. Vliv profágů na organizaci genomu *S. aureus* lze pozorovat například jako



změnu makrorestrikčního spektra po PFGE u lyzogenních kmenů (SMELTZER aj. 1994, BORECKÁ aj. 1996).

Profágová typizace je založena na skutečnosti, že genomy profágů jsou velmi polymorfni, a že i blízce příbuzné kmeny obsahují různé profágy (kombinace profágů). Tyto předpoklady odráží vysokou rozlišovací sílu metody. Až stoprocentní typovatelnost lze očekávat díky velmi vysokému podílu lyzogenních kmenů *S. aureus* (PANTŮČEK aj. 2004).

Základem pro zavedení profágové typizace jsou osekvenované fágové genomy, u nichž bylo možné identifikovat sekvence specifické současně pro fágové serologické skupiny a druhy (seroskupina A - druh 3A, B - 11, F - 77, L - 187) (BORECKÁ aj. 1996, DOŠKAŘ aj. 2000). Hybridizací sond s restričně štěpenou bakteriální DNA pak vzniká charakteristický DNA fingerprint, který umožňuje odlišení i blízce příbuzných kmenů.

Specifické fágové sekvence lze rovněž využít jako základ pro přípravu PCR primerů. PCR primery navržené tak, aby amplifikační produkty specifické pro různé seroskupiny (druhy) byly různých délek, slouží k provedení multiplex PCR. V průběhu jedné PCR reakce tak vznikají pro každý fágový druh produkty charakteristické velikosti, které vytváří profágový profil kmene. Multiplex PCR je metodicky jednodušší a rychlejší než hybridizace s molekulárními sondami (PANTŮČEK aj. 2004).

## 2. CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE

Cílem diplomové práce je ověření možnosti použití profágové typizace, založené na selektivní hybridizaci se směsí sond specifických pro genomy fágů čeledi *Siphoviridae*, pro odlišení blízce příbuzných kmenů *S. aureus*.

Dílčími cíli jsou:

1. Klonování profágově specifických sekvencí.
2. Příprava směsi profágově specifických sond.
3. Výběr vhodného restrikčního enzymu pro detekci RFLP polymorfizmů u bakteriálních genomových DNA.
4. Hybridizace restrikčních spekter se směsí sond.
5. Stanovení typovatelnosti a rozlišovací síly metody.
6. Srovnání metody se stávajícími metodami používanými pro *S. aureus* na souboru 18 epidemických nemocničních kmenů klinického původu.

## 3. MATERIÁL A METODY

### 3.1. Bakteriální kmeny a bakteriofágy

Bakteriofágy *S. aureus* 84, 77, 187, 6, 42E, 47, 54, 75, 94, 3C, 3A, Φ11, 85, 53, 96, 95, 55, 50, 29, Φ13 a 187, kmen *S. aureus* NCTC 8325 a kmen *Escherichia coli* DH5α pochází ze sbírek Ústavu experimentální biologie, Oddělení genetiky a molekulární biologie MU. Nemocniční kmeny meticilin rezistentní *S. aureus* (521, 522, 523, 524, E2, E5, E11, E13, E14, E15, E16, E34, E50, 9, 13, 14, 20, 98/64) byly získány z Fakultní Nemocnice v Brně-Bohunicích a z několika nemocnic v Praze (tabulka 9).

### 3.2. Izolace DNA

**Izolace fágové DNA.** Izolace DNA fágů 84, 77, 187, 6, 42E, 47, 54, 75, 94, 3C, 3A, Φ11, 85, 53, 96, 95, 55, 50, 29, Φ13, 187 byla provedena v předchozích experimentech na Oddělení genetiky a molekulární biologie metodou fenolové extrakce podle Doškaře aj. (2000).

**Izolace vektorů pBluescript II SK+ a pUC18** (bez inzertu i rekombinantních) z bakteriálního kmene DH5α byla provedena pomocí komerční soupravy High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche). Izolace je založena na principu alkalické lyze. Kultivace kmene probíhala 16 hodin v LB bujónu (trypton Oxoid 10 g/l, kvasnicový extrakt Oxoid 5 g/l, NaCl 5 g/l, pH 7,0) s přidavkem 50 µg/ml ampicilinu (Sigma). Výchozí objem bakteriální kultury pro izolaci vektoru byl 7,5 ml.

**Izolace bakteriální chromozomové DNA.** Bakteriální kmeny byly kultivovány 18 hod/37 °C v 2YT médiu (trypton Oxoid 16 g/l, kvasnicový extrakt Oxoid 10 g/l, NaCl 5g/l, pH 7,0). Izolace byla provedena pomocí komerční soupravy High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche) s následujícími modifikacemi: 7 ml bakteriální kultury bylo centrifugováno 10 min/4500 rpm (centrifuga Jouan BR4, rotor S40), promyto 4 ml promývacího pufru (0,1 M NaCl, 10 M Tris-Cl, 1 mM EDTA, pH 8,0) a opět centrifugováno za stejných podmínek. K vysušenému peletu bylo přidáno 280 µl PBS (0,14 M NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,8 mM KH<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7,4), 20 µl lyzostafinu (Sigma) a inkubováno při 37 °C dokud nedošlo k lyzi, tj. asi 1 hod. Poté bylo přidáno 300 µl pufru č.2 (Binding Buffer), 50 µl proteinázy K, dobře promícháno a inkubováno nejprve 10 min/72 °C, pak 15

min/55 °C. Směs se nechala vychladnout, bylo přidáno 150 µl izopropanolu, opatrně promícháno a zcentrifugováno přes kolonku 1 min/10000 rpm (centrifuga Jouan BR4, rotor AB 1.14). Následovalo promytí a eluce podle postupu výrobce.

### **3.3. Restrikční štěpení**

Restrikční štěpení byla prováděna podle práce Sambrook aj. (1989) restrikčními enzymy *Xba*I, *Eco*RI, *Cla*I, *Hind*III (Roche), *Sac*I, *Sal*I, *Sma*I (New England BioLabs). K přípravě restrikčních směsí byly užity příslušné restrikční pufrů, dodané stejnými firmami.

Bakteriální genomová DNA byla štěpena 16 hod. K bakteriální DNA určené k agaróze elektroforéze a kapilárnímu přenosu bylo po 4 hod přidáno 0,17 U RE/µl. Fágové genomové DNA byly štěpeny 4 hod. DNA vektorů a PCR produktů byly štěpeny 2 hod.

### **3.4. Elektroforéza**

Elektroforéza byla prováděna (pokud není uvedeno jinak) v 1,2% agarózovém gelu v 1 × TAE pufru (0,04 M Tris, 0,002 M EDTA, pH 8,2). DNA byla nanášena na gel s nanášecím pufrů (1/5 objemu směsi), složeným z 0,25% bromfenolové modři a 40% sacharózy. Pro stanovení velikosti PCR produktů a k ověření klonů byl použit hmotnostní standard 100 bp DNA Ladder (New England BioLabs), pro DNA určenou na kapilární přenos standard VII značený digoxigeninem (Roche), v ostatních případech standard VII (Roche). K přípravě gelu, použitého pro kapilární přenos byla použita agaróza firmy Serva, k přípravě gelu z něhož byla izolována DNA byla použita Ultra Pure agaróza firmy Gibco BRL, v ostatních případech agaróza firmy Lachema. K zviditelnění DNA byly gely obarveny v roztoku ethidium bromidu (1 µg/ml TAE) a vyfotografovány přístrojem Kodak, EDAS 290 pod UV zářením 302 nm.

### **3.5. Příprava směsi fágových sond**

#### **3.5.1. Vyhledání fágových sekvencí k přípravě molekulárních sond**

Konzervativní fágové sekvence, ze kterých byly odvozeny univerzální fágové sondy, byly vyhledány pomocí programu mVISTA (<http://www-gsd.lbl.gov/VISTA>) srovnáváním 18 osekvenovaných fágových genomů. Stejný program byl užit k vyhledání sekvence společné

řágům serologické skupiny F<sub>b</sub>. Sekvence řágových genomů jsou uloženy v databázi GeneBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank>) pod následujícími přístupovými kódy: řág ETA (NC\_003288), profág PVL (NC\_002321), profág PV83 (NC\_002486), řág SLT (NC\_002661), profág Φ11 (NC\_004615), profág Φ12 (NC\_004616), profág Φ13 (NC\_004617), profág Sa2(MW2) (NC\_003923), profág Sa3(MW2) (NC\_003923), profág Sa2(252) (NC\_002952), profág Sa3(252) (NC\_002952), profág Mu50A (NC\_002758), profág Mu50B (NC\_002758), profág N315 (NC\_004740), profág Sa3(476) (NC\_002953), profág Sa4(476) (NC\_002953), řág 77 (NC\_005356), řág COL (NC\_002951).

### 3.5.2. Vyhledání restrikčních míst ohraničujících sekvenci sondy

Restrikční místa pro klonování, ohraničující sekvenci sondy, byla vyhledána pomocí programu Oligo, Version 6.59 (Molecular Biology Insights, Inc.) a programu NEBcutter V2.0 (<http://tools.neb.com/NEBcutter2>).

### 3.5.3. PCR řágových DNA

PCR primery byly navrženy pomocí programu Oligo, Version 6.59 (Molecular Biology Insights, Inc.) a syntetizovány firmou Invitrogen. Sekvence PCR primerů jsou uvedeny v tabulce 3. Reakční směsi (25μl) se skládaly z 2 μM Tris-Cl (pH 8,4) a 5 μM KCl (obsaženo v 10 × PCR buffer), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,06 U/μl *Taq* DNA polymerázy (vše od firmy Invitrogen), 200 μM každého nukleotidu (Roche), 0,5 μM každého primeru, a 50 ng templátové DNA v objemu 3 μl. PCR byla optimalizována při teplotním gradientu 10 °C, 30 amplifikačních cyklů probíhalo za podmínek: denaturace (1 min, 94 °C), nasedání primerů (1 min, 52 °C), prodlužování řetězce DNA (1 min, 72 °C). T<sub>a</sub> vybrané na základě optimalizace pro další PCR jsou uvedeny v tabulce 3. Ostatní parametry dalších PCR byly stejné jako při optimalizaci. PCR byla prováděna na DNA termocykleru (model Tgradient, Biometra). Přečištění PCR produktů bylo prováděno pomocí komerční sady QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN).

**Tab. 3.** PCR primery

<i>rinB</i> Φ11	GAATTCCTTGAGACTATTATTCTTACTAGCGA	T <sub>a</sub> = 56 °C
	TCTAGACTGATCACTCAACTTTGCGAAGTC	
ORF38 Φ11	CCTAGGAGCTCTACTATGCTTCACAGTCTTAGCG	T <sub>a</sub> = 48 °C
	CCTTATCGATTATGAATGTTGCGATACTTG	
fragment Φ13	CATTGATTGATGTTGCCTACACG	T <sub>a</sub> = 49 °C
	CGGGCTATATTGAAATTACACG	

### 3.5.4. Klonování ve vektoru pBluescript II SK+ (Invitrogen)

**Příprava kompetentních buněk** bakteriálního kmene *E. coli* DH5a byla provedena podle práce Sambrook aj. (1989), kompetence byla navozena roztokem CaCl<sub>2</sub>.

**Restrikční štěpení vektoru pBluescript II SK+ a PCR produktů** proběhlo v 50μl restrikčních směsí:

pBluescript / PCR produkt *rinB* Φ11 → *Xba*I, *Eco*RI

pBluescript / PCR produkt Φ13 → *Sac*I, *Sal*I

pBluescript → *Sma*I

Přečištění štěpených DNA bylo provedeno stejně jako u PCR produktů v kapitole 3.5.3.

**Ligace štěpené vektorové DNA a PCR produktu** byla provedena dvěma způsoby:

1. Štěpený PCR produkt *rinB* Φ11 byl smíchán s příslušně štěpeným vektorem v poměrech 0,1 μl + 0,1 μl, 0,1 μl + 1 μl, 0,1 μl + 5 μl, 1 μl + 0,1 μl, 1 μl + 1 μl, 1 μl + 5 μl, 5 μl + 0,1 μl, 5 μl + 1 μl, 5 μl + 5 μl, inkubován 5 min při 45 °C a zchlazen na 4 °C. Ke každé směsi byly přidány 0,1 U T4 DNA ligázy (Roche) a 2 μl ligačního pufru (10 × Ligation Buffer, Roche), směs byla doplněna redestilovanou H<sub>2</sub>O do 20 μl a následovala inkubace 18 hod při 16 °C. Ligace štěpeného PCR produktu Φ13 a příslušně štěpeného vektoru proběhla za stejných podmínek.
2. Neštěpený PCR produkt ORF38 Φ11 byl smíchán se *Sma*I štěpeným vektorem v poměrech 0,5 μl + 0,5 μl, 0,5 μl + 1,5 μl, 0,5 μl + 3 μl, 1,5 μl + 0,5 μl, 1,5 μl + 1,5 μl, 1,5 μl + 3 μl, 3 μl + 0,5 μl, 3 μl + 1,5 μl. Ke každé směsi byly přidány 3U T4 DNA ligázy a 5 μl ligačního pufru (2 × Rapid Ligation Buffer, Promega), směs byla doplněna redestilovanou H<sub>2</sub>O do 10 μl a následovala inkubace 15 min při 24 °C.

**Transformace kompetentních buněk rekombinantním vektorem** byla provedena metodou tepelného šoku podle práce Sambrook aj. (1989). Jako kontrola byla provedena transformace neštěpeným a štěpeným vektorem bez inzertu.

**Selekce rekombinantních klonů** proběhla na médiu s ampicilinem (100 μg/ml), X-gal (40 μg/ml) a IPTG (0,5 mM) metodou alfa-komplementace β-galaktozidázy.

### 3.5.5. Izolace štěpených fágových fragmentů a PCR produktů z agarózového gelu

Rekombinantní vektory byly štěpeny příslušnými restriktázami ve 120μl restrikčních směsí. K izolaci fragmentů a PCR produktů z 0,7% agarózy byla použita komerční sada QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN). Izolovány byly níže uvedené fragmenty a PCR produkty. Tučně vyznačené fágové fragmenty byly naklonovány dříve na Oddělení GMB,

standardní technikou podle práce Sambrook aj. (1989) do vektoru pUC18, kromě fragmentu fága 187 klonovaného do vektoru pBluescript II SK+.

**Serologická skupina A, druh 3A: *EcoRI*-D fragment DNA fága 3A (5002 bp)**

**Serologická skupina B, druh 11: *HindIII*-B fragment DNA fága 53 (3924 bp)**

**Serologická skupina F<sub>a</sub>, druh 77: *HindIII*-A fragment DNA fága 77 (8400 bp)**

Serologická skupina F<sub>b</sub>, druh 77: *SalI*-*SacI* fragment DNA fága Φ13 (1056 bp)

**Serologická skupina L, druh 187: *HindIII*-H fragment DNA fága 187 (1926 bp)**

Univerzální fágové sekvenec:

PCR produkt sekvence podobné ORF38 fága PVL na DNA fága Φ11 (107 bp)

PCR produkt sekvence genu pro transkripční aktivátor *rinB* na DNA fága Φ11 (121 bp)

### 3.5.6. Neradioaktivní značení izolovaných DNA

Restrikční fragmenty byly značeny digoxigeninem pomocí komerční soupravy Dig High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I (Roche), která využívá Klenowův enzym k syntéze DNA a značení DIG-11-dUTP pomocí náhodných hexanukleotidů. Označené fragmenty byly přečištěny vysrážením pomocí LiCl a etanolu: DNA byla vysrážena přidáním 2,5 μl 4 M LiCl a 75 μl 96% etanolu (-20 °C), směs byla opatrně promíchána a inkubována 60 min/70 °C. Následovala centrifugace 25 min/15000 rpm (centrifuga Jouan BR4, rotor AB 1.14). Pelet byl ponechán 10 min v 500 μl 70% etanolu, pak byl etanol odsát a pelet vysušen. Nakonec byl pelet rozpuštěn v 50 μl TE pufru (10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA, pH 8), zchlazen 1 hod/4 °C a umístěn do -20 °C.

## 3.6. Pulzní gelová elektroforéza

### 3.6.1. Izolace bakteriální genomové DNA

Izolace byla provedena podle Pilousové (2003) s následujícími modifikacemi: Bakteriální kmeny byly kultivovány 18 hod/37 °C v 2YT médiu. Ke 14 ml kultury bylo přidáno 140 ml EDTA, směs byla zchlazena 10 min/4 °C a zcentrifugována 10 min/4100 rpm/ 4°C (centrifuga Jouan BR4, rotor S40). Pelet byl dvakrát promyt ve 12 ml promývacího roztoku (10 mM Tris-Cl, 10 mM EDTA, 10 mM EGTA, 1 M NaCl, pH 7,5) zchlazeného na ledě a bakteriální suspenze byla naředěna na OD 0,2 (měřeno na CO8000 Cell Density Meter, WPA Biowave). 10 ml suspenze bylo zcentrifugováno 10 min/4100 rpm a resuspendováno v 100 μl stejného roztoku. Dále byla modifikována množství enzymů: k lyzačnímu roztoku bylo přidáno 500

$\mu\text{g/ml}$  lysozymu a  $200 \mu\text{g/ml}$  lyzostafinu (nebyla přidávána RNáza), k deproteinizačnímu roztoku  $500 \mu\text{g}$  proteinázy K (Roche).

### **3.6.2. Pulzní gelová elektroforéza**

Štěpení bakteriální DNA restriktázou *SmaI* a pulzní gelová elektroforéza byly provedeny podle Pilousové (2003). Elektroforéza byla provedena na přístroji CHRF-DRII firmy Bio-Rad, za podmínek: pulzní časy 0,5 - 50 s, lineární vzestup, teplota  $14 \text{ }^\circ\text{C}$ , napětí 170 V, doba elektroforézy 31 hod, 1,2% agarózový gel délky 14 cm.

## **3.7. Hybridizace nukleových kyselin se směsí sond**

### **3.7.1. Southernův přenos bakteriální a fágové DNA**

Southernův kapilární přenos byl proveden podle Pilousové (2003). Hybridizační membrána (Roche) byla použita přímo, bez namočení v deionizované vodě a v  $10 \times \text{SSC}$ .

### **3.7.2. Hybridizace bakteriální a fágové DNA se směsí sond**

Prehybridizace v standardním hybridizačním pufru ( $5 \times \text{SSC}$ , 1% N-laurylsarkosin, 0,02% SDS, 1% Blocking reagent) a hybridizace DNA se směsí sond probíhala při  $68 \text{ }^\circ\text{C}$  podle Pilousové (2003). Imunologická detekce navázaných sond byla provedena navázáním protilátky anti-Digoxigenin-AP (Roche) a obarvením pomocí NBT-BCIP (Roche) s využitím DIG DNA Detection Kit (Roche) podle návodu výrobce.



## 4. VÝSLEDKY

### 4.1. Vyhledání fágových sekvencí DNA k přípravě fágově specifických sond

Hlavním cílem této práce byla příprava fágově specifických molekulárních sond pro selektivní hybridizaci, která by umožnila získat specifický fingerprint DNA v závislosti na obsahu profágů v bakteriálním genomu *S. aureus*. V rámci tohoto cíle byla plánována příprava 2 univerzálních fágových sond a 5 sond specifických zároveň pro fágové serologické skupiny a druhy. Sekvence specifické pro 4 serologické skupiny (A, B, F<sub>a</sub> a L) již byly identifikované (PANTŮČEK aj. 2004) a k dispozici v podobě rekombinantní DNA. Součástí této práce měla být identifikace a klonování univerzálních sekvencí společných všem mírným stafylofágům čeledi *Siphoviridae* a dále klonování sekvence specifické pro serologickou skupinu F<sub>b</sub>.

K vyhledání univerzálních fágových sekvencí bylo srovnáno 17 osekvenovaných fágových genomů převzatých z databáze GenBank. Mezi těmito fágy byly nalezeny čtyři vysoce konzervované sekvence. Jedná se o nekódující oblast mezi genem pro integrázu a excizionázu, oblast homologní k ORF38 fága PVL, oblast homologní ke genu *rinB* fága Φ11 a nekódující oblast před genem pro holin (obrázek 2). K přípravě 2 univerzálních sond byly vybrány nejdelší z těchto sekvencí: ORF38 a *rinB*.

Srovnáním 5 osekvenovaných genomů fágů serologické skupiny F<sub>b</sub>: Φ13, PVL, PV83, Sa3(MW2), Sa3(476), byla vyhledána oblast, specifická pro fágy této serologické skupiny (obrázek 3). Jedná se o sekvenci, která se nachází v modulu sbalování a hlavy na genomu fága Φ13 a zahrnuje následující lokusy: malá podjednotka terminázy – sekvence podobná ORF3 fága PVL – portálový protein – kapsidová proteáza.

### 4.2. Klonování sekvencí pro přípravu sond ve vektoru pBluescript II SK+:

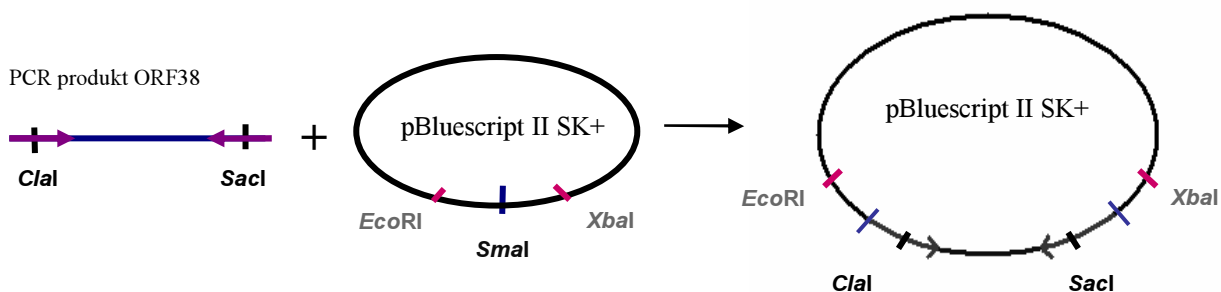
Ke klonování fágových sekvencí bylo třeba vyhledat restriční místa, která tyto sekvence ohraničují a zároveň jsou přítomná v polylinkeru vektoru pBluescript II SK+. V sekvenci specifické pro fágy serologické skupiny F<sub>b</sub> byla vyhledána restriční místa *SaII* a *SacI*. Sekvence univerzálních sond neobsahovaly vhodná restriční místa, proto byla sekvence restričních míst připojena k 5'-koncové sekvenci PCR-primerů (obrázek 4).

Vyhledané fágové sekvence byly amplifikovány pomocí PCR. Všechny PCR-primery byly nově navrženy programem Oligo. Primery k amplifikaci *rinB* fága  $\Phi 11$  byly modifikovány na 5'-koncích připojením restričních míst *EcoRI* a *XbaI*. Stejně byly modifikovány také primery k amplifikaci ORF38 fága  $\Phi 11$ . PCR produkty ORF38 fága  $\Phi 11$  se však nepodařilo naklonovat. Proto byl zvolen odlišný způsob modifikace 5'-koců PCR-primerů. Z navržených primerů, které připadaly v úvahu k amplifikaci ORF38, byly vybrány ty, které obsahovaly sekvenci s co největší homologií k sekvenci některého restričního místa v polylinkeru vektoru pBluescript. Jednalo se o dvojici primerů, kde jeden z nich obsahoval sekvenci podobnou sekvenci restričního místa *SacI* a druhý sekvenci podobnou sekvenci restričního místa *ClaI*. Primery byly upraveny tak, aby zmiňované sekvence byly totožné se sekvencemi příslušných restričních míst. V těchto sekvencích pak sice primery nebyly zcela homologické s templátovou DNA, nicméně homologie byla dostačující ke specifickému nasedání primerů. PCR-primery k amplifikaci sekvence fága  $\Phi 13$  byly navrženy tak, že ve vyhledané konzervativní sekvenci ohraničují část genu pro portálový protein a genu pro kapsidovou proteázu (obrázek 4).

PCR byla optimalizována při teplotním gradientu 10 °C. PCR produkty fágových sekvencí byly ověřeny elektroforézou na agarózovém gelu (obrázek 5). PCR produkty a vektor pBluescript II SK+ byly štěpeny příslušnými restričními enzymy a ligovány. Ligační směsi byly transformovány kompetentní buňky DH5 $\alpha$ .

Sekvenci ORF38 se však opět nepodařilo naklonovat. Proto byl zvolen alternativní přístup, kdy byl ligován neštěpený PCR produkt a vektor štěpený *SmaI* restričním enzymem, který tvoří tupé konce (obrázek 1).

**Obr. 1.** Schéma klonování PCR produktu ORF38



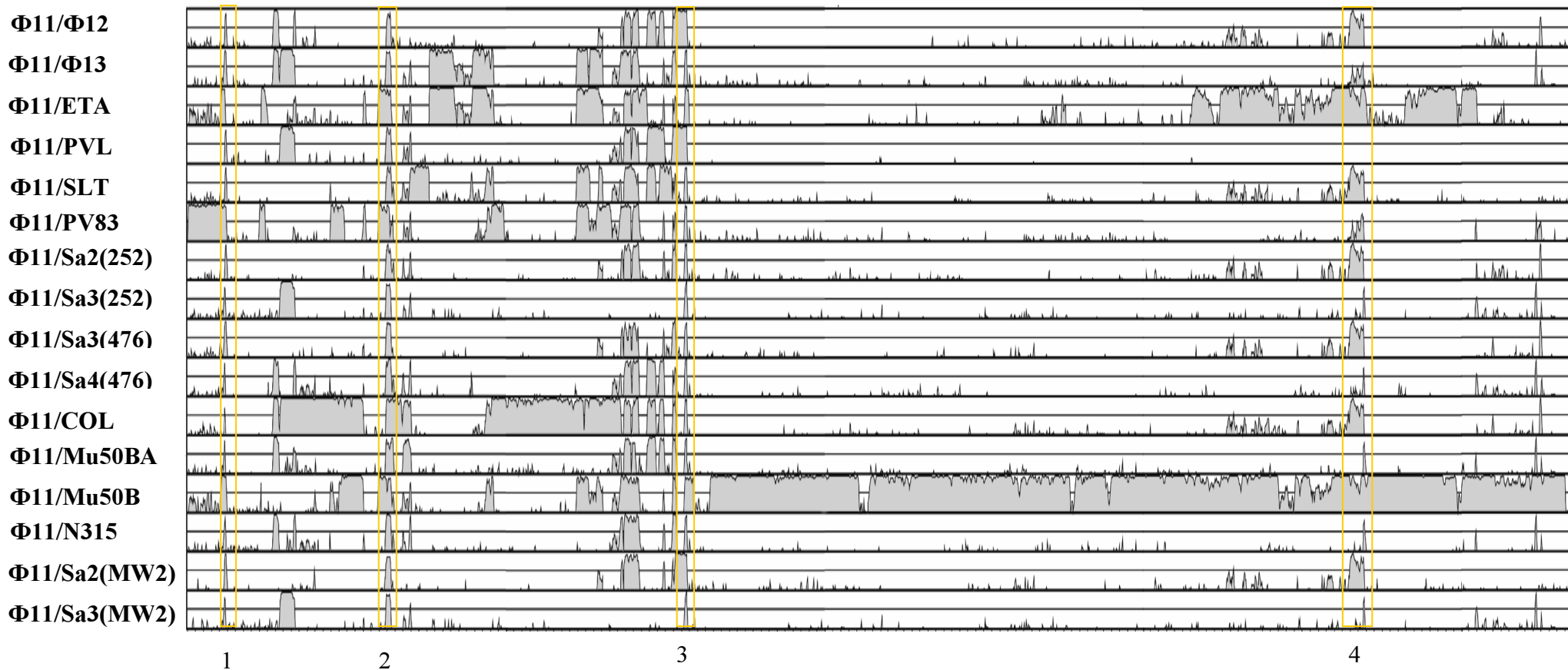
Úspěšnost klonování byla ověřena u kolonií buněk DH5 $\alpha$  vybraných na základě modrobílého testu. Naklonované fragmenty byly vyštěpeny z rekombinantních vektorů příslušnými restrikčními enzymy a podrobeny agarózové elektroforéze.

Ze tří potenciálních klonů fragmentu fága  $\Phi$ 13 (bíle zbarvené kolonie), označených jako klony č. 1, 2 a 3, nesly pouze klony č. 1 a 2 rekombinantní vektor se začleněným inzertem (obrázek 6). Klon č. 3 nesl vektor, který buď neobsahoval žádný inzert nebo obsahoval malý inzert o velikosti nedetekovatelné agarózovou elektroforézou.

Při klonování sekvence *rinB* byla identifikována řada potenciálních klonů, dalšímu ověřování byly podrobeny klony 1a, 1c, 2, 3c a 3a. Klony 3a a 3c nesly vektor s *rinB* inzertem (obrázek 7), u ostatních klonů byla situace stejná jako u klonu č. 3 fága  $\Phi$ 13.

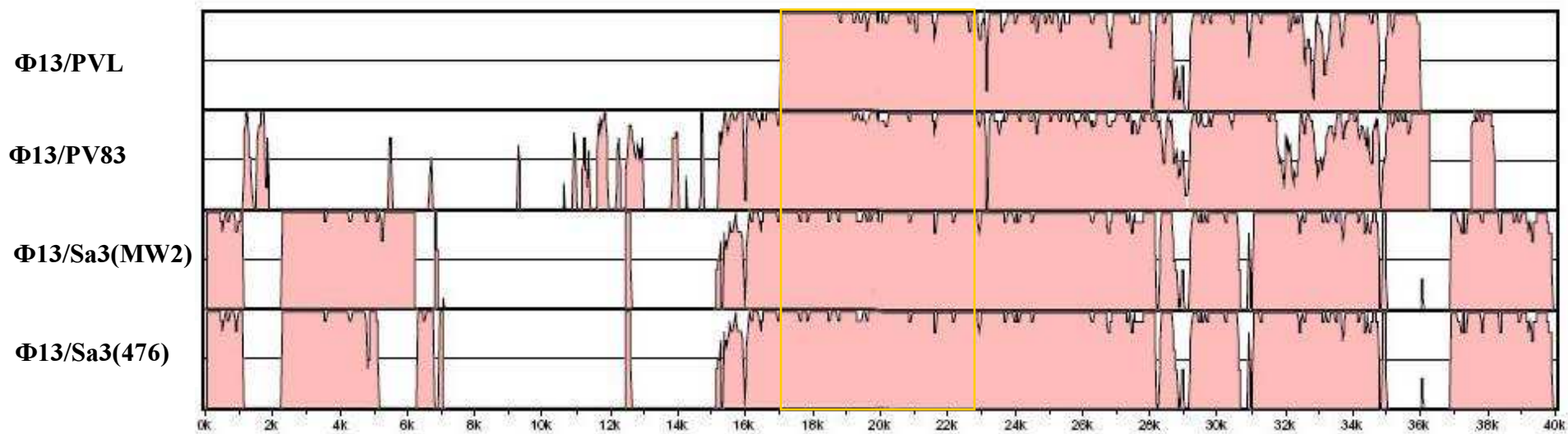
V případě ORF38 byly z vytipovaných klonů vybrány klony č. 2a, 2b, 2c, 3a, 3b, 3c, 5, 6a, 6b a 8, u kterých byla přítomnost inzertu ověřena pomocí PCR – ve všech případech byl výsledek pozitivní (obrázek 8). Dále byl vybrán klon č. 3a, u kterého následovalo ověření pomocí restrikčního štěpení. K ověření byly použity dvě dvojice restrikčních enzymů: *SacI* + *ClaI*, jejichž restrikční místa byla přítomna v sekvenci PCR-primerů a *EcoRI* + *XbaI*, s restrikčními místy přítomnými v polylinkeru vektoru pBluescript II SK+ (obrázek 1 a 9).

**Obr. 2.** Srovnání sekvencí 17 fágových genomů k vyhledání univerzálních fágových sekvencí společných mírným stafylofágům



1. nekódující oblast mezi genem pro integrázu a excizionázu
2. oblast homologní k ORF38 fága PVL
3. oblast homologní ke genu *rinB* Φ11
4. nekódující oblast před genem pro holin

**Obr. 3.** Srovnání genomových sekvencí fágů serologické skupiny F<sub>b</sub> k vyhledání sekvence specifické pro fágy této skupiny



žlutým rámečkem je označena oblast homologie, která zahrnuje oblast v modulu sbalování a v modulu hlavy (gen pro malou podjednotku terminázy – sekvence podobná ORF3 fága PVL – gen pro portálový protein – gen pro kapsidovou proteázu)

**Obr. 4.** Klonované fágové sekvence navržené jako univerzální sondy pro detekci profágů

a) Sekvence podobná ORF38 fága PVL na genomu fága Φ11  
(NC\_004615; 6218...6336)

GAGCTC

```

1 CCTAGTAGCAGTACTATGCTTCACAGTCTTAGCGATTGTACTTATGCCGTTTCTATACTT
61 CACTACAGCATGGTCAATTGCAGGATTCGCAAGTATCGCAACATTCATATTTCTATAAGG
ATCGAT

```

Podtržené sekvence označují sekvence PCR-primerů. Oranžově je označena sekvence restričního místa *SacI* a fialově restričního místa *ClaI*, které jsou součástí PCR-primerů. Tučně jsou označeny nukleotidy, ve kterých se neshoduje sekvence templátové DNA se sekvencí primerů.

b) Sekvence *rinB* fága Φ11 (NC\_004615; 15588...15713)

```

1 TTGAGACTATTATTCTTACTAGCGATGTATGAGTTAGGTAAGTATGTAAGTACTGAGCAAGTA
61 TATATTATGATGACGGCTAATGATGATGTAGAGGCGCCAAGTGAAGTTCGCAAAGTTGAGT
121 GATCAG

```

Podtržené sekvence označují sekvence PCR-primerů. Oranžově a fialově jsou znázorněny sekvence restričních míst *EcoRI* (GAATTC) a *XbaI* (TCTAGA), které byly připojeny k 5'-koncové sekvenci PCR-primerů.

c) Sekvence v modulu hlavy fága Φ13 (NC\_004617; 19791...21048)

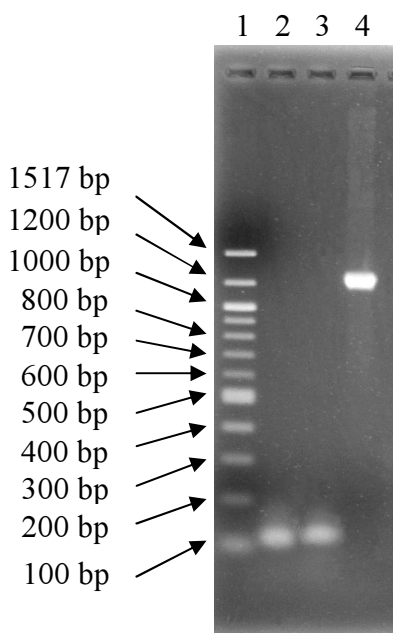
```

1 CATTGATTGATGTTGCCTACACGCATGTTCTCATATAAATCACGTGCAAATGTTGTGTTT
61 GGTAACCTACAACGATATTTAAGTCCAACATCATCAGTTTCGAGCTCCAAAGTACCCGAT
121 TTTGTCTACCAATTATTTGCGATGGGATATGATCTACTAAACAACGCACATCAGATAAAA
181 TCAGTGTTTTCTAAAGCGCGACGTGAAATCGTTTCTTTGAATCCACCAAGATTTTCAGAC
241 CAAAGTGTCAAACTTTAACGCATACCCCTCTATGACCATTTTCGTTGTTATCATTTGAGCGT
301 ACCTCAATAATGTTGCCAACTCTCGTTTCTTACTCATTTTCTCACCACCTTTCAATTT
361 TTTATCAGTAGCTCTCGATTTATTCATCTGATACTCATCTACAAGTTCAATATTTACATG
421 GTTTAAATCGACTCTGTGAATGCTACCATTACCGCCTGGTATTGGCGCTAATCCATCAGC
481 TTGTCTAATTTTCATCGATATTCATCTTTCCAGAATCAATGTTAATTTTGTCAATTTGAGC
541 TTGTGTTTTTTTCATCAACAACCTCGTATTTTCAGTGGTATCAAATTTAAATTCACGATTCAC
601 ATATTCATCATTTAACTTAAAATTCATTTCTGCACAAACGCATGTAATATAAGGTTTTAA
661 AGTTGATAAGTAATCTAAATTAGCATCCGTGATACTCATGTTTCGCTGTTTCTATGCCGAA
721 CTTATGCAATGGAATACCAATACACCTGCTATTTCTCTTGTGATGATTTGTTTTCTCT
781 GATAAGCTTTAAAACCTTCTGTATCAACTTCTAATTGATCAAACGTCATTGATTCATCGAG
841 TACGACAACCTTTCCAGCTTGTTTAGTTCCACTAAAACCTTTTGTGAAATTCCTTCTGCG
901 ACGGTCTCTTGCTTTTTTATTATCTAATACACCTTTTCATTTTCAAATACCACCAGCATG
961 TGTGCCATTTTCGCAAGAAATTAATTAAGGAAATCTTTTCCATTGTTATCTGATTCTATCGT
1021 GCGACTTAATGTGTCTAACAGTGACAAACCATTTATACCATCCAACGAATAAAATTTGAT
1081 GTCTAGCATATCTCAAACCTAACATTACGTTCTATATTTCCGTTACTGTCTATCCT
1141 TTGATGAAAATAATACAGTCGACCTCTTGCCTGCTGATTTCAATTCATTTCCGGATGTCTT
1201 TCTGAACGTTAAATTCATAGGTTCTCCTGTTTTATCAGTGTAATTTCAATATAGCCG

```

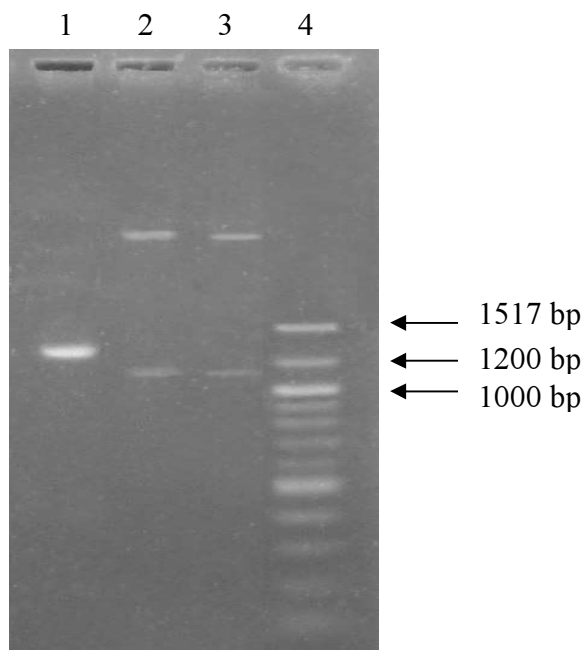
Podtržené sekvence označují sekvence PCR-primerů. Oranžově a fialově jsou znázorněny sekvence restričních míst *SacI* a *SalI*.

**Obr. 5.** Agarózová gelová elektroforéza znázorňující PCR produkty *rinB*, ORF38 a  $\Phi$ 13



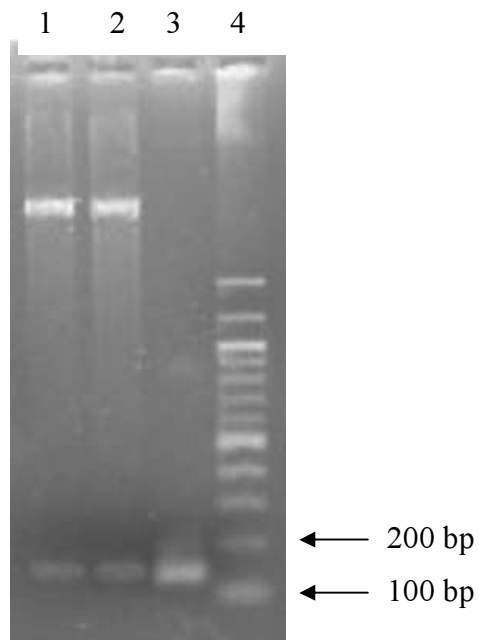
(1) 100 bp ladder, (2) PCR produkt ORF 38 (119 bp), (3) PCR produkt *rinB* (138 bp), (4) PCR produkt  $\Phi$ 13 (skupina F<sub>b</sub>) (1258 bp)

**Obr. 6.** Agarózová gelová elektroforéza znázorňující ověření klonu  $\Phi$ 13 (skupina F<sub>b</sub>)



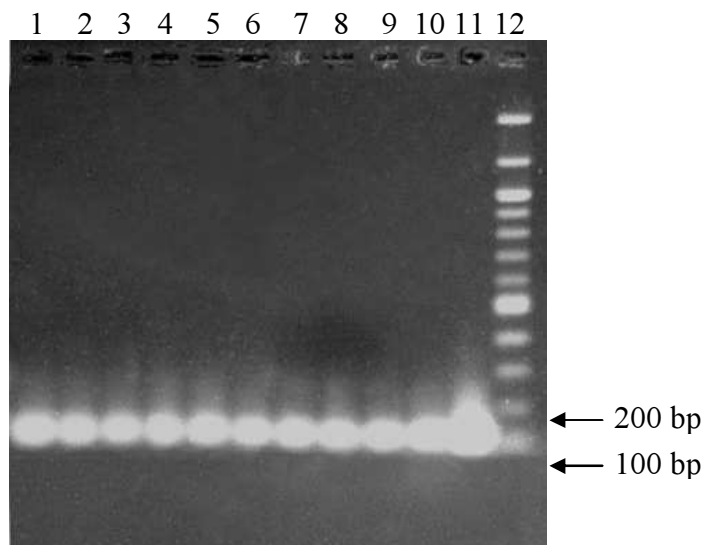
(1) PCR produkt  $\Phi$ 13 (1258 bp), (2) klon fragmentu  $\Phi$ 13 č. 2 štěpený restriktázami *SacI* a *SalI*: vektor pBluescript (2,96 kb) + naklonovaný *SacI-SalI* fragment  $\Phi$ 13 (1061 bp); ten je o 197 bp menší než PCR produkt, který byl před klonováním zkrácen štěpením restriktázami *SacI* a *SalI*, (3) klon fragmentu  $\Phi$ 13 č. 1 štěpený RE *SacI* a *SalI*, (4) 100 bp ladder

**Obr 7.** Agarózová gelová elektroforéza znázorňující ověření klonu *rinB*



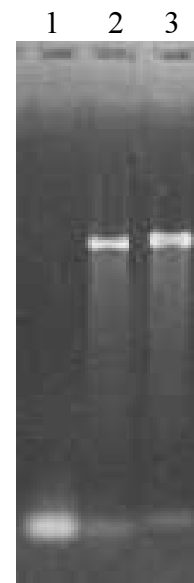
(1) klon *rinB* č. 3c štěpený restriktázami *EcoRI* a *XbaI*: vektor pBluescript (2,96 kb) + naklonovaný PCR produkt (138 bp), (2) klon *rinB* č. 3a štěpený RE *EcoRI* a *XbaI*, (3) PCR produkt *rinB* (138 bp), (4) 100 bp ladder

**Obr 8.** Agarózová gelová elektroforéza znázorňující ověření klonu ORF38 pomocí PCR



(1) – (10) PCR produkty jednotlivých klonů ORF38 (119 bp), (1) klon č. 3a, (2) klon č. 2b, (3) klon č. 5, (4) klon č. 8, (5) klon č. 6a, (6) klon č. 2c, (7) klon č. 3b, (8) klon č. 6b, (9) klon č. 3c, (10) klon č. 2a, (11) PCR produkt ORF38 fága Φ11, (12) 100 bp ladder

**Obr 9.** Agarózová gelová elektroforéza znázorňující ověření klonu ORF38 restrikčním štěpením



(1) PCR produkt ORF38 fága Φ11 (2) klon ORF38 č. 3a štěpený *SacI* a *ClaI* (RE místa přítomna v sekvenci PCR primerů): vektor pBluescript (větší fragment) + naklonovaný PCR produkt (3) klon ORF38 č. 3a štěpený *EcoRI* a *XbaI* (RE místa přítomna v polylinkeru vektoru): vektor pBluescript (větší fragment) + vyštěpený *EcoRI-XbaI* fragment

### 4.3. Izolace naklonovaných fágových fragmentů z agarózového gelu

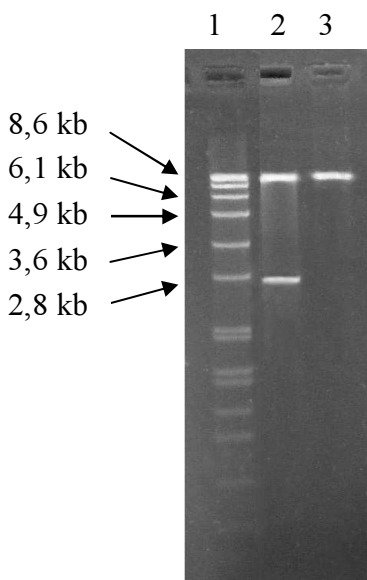
Pro značení sond digoxigeninem bylo nutné získat dostatečné množství purifikovaného fragmentu DNA. Naklonované fágové fragmenty, specifické pro fágové seroskupiny, byly vyštěpeny z rekombinantních vektorů příslušnými restrikčními enzymy a izolovány z agarózového gelu. Jednalo se o:

1. *SacI-SalI* fragment fága Φ13 (seroskupina F<sub>b</sub>) naklonovaný v této práci, (obrázek 12)
2. Fágové fragmenty naklonované na pracovišti dříve:
  - i. *EcoRI*-D fragment DNA fága 3A (seroskupina A), (obrázek 11)
  - ii. *HindIII*-B fragment DNA fága 53 (seroskupina B), (obrázek 13)
  - iii. *HindIII*-A fragment DNA fága 77 (seroskupina F<sub>a</sub>), (obrázek 10)
  - iv. *HindIII*-H fragment DNA fága 187 (seroskupina L), (obrázek 13)



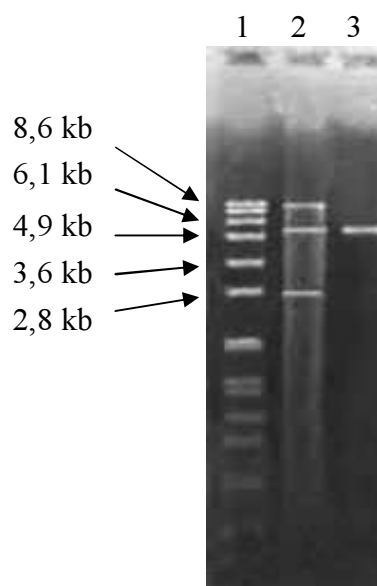
3. Vyštěpené fragmenty ORF38 fága  $\Phi$ 11 a *rinB* fága  $\Phi$ 11 nebylo možné izolovat z agarózového gelu v dostatečné koncentraci, proto byly k přípravě univerzálních sond použity vyizolované PCR produkty.

**Obr. 10.** Agarózová gelová elektroforéza znázorňující výsledek izolace fragmentu fága 77 z agarózového gelu



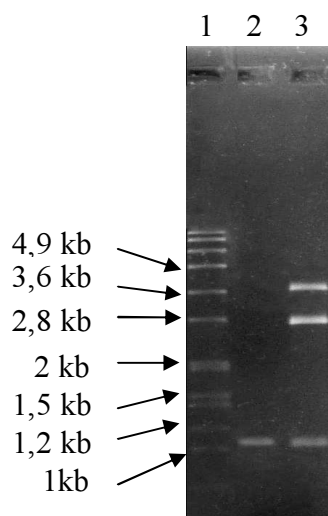
(1) DNA standard VII, (2) vektor pUC18 (2,69 kb) a vyštěpený fragment fága 77 (8400 bp), (3) vyizolovaný fragment fága 77

**Obr. 11.** Agarózová gelová elektroforéza znázorňující výsledek izolace fragmentu fága 3A z agarózového gelu



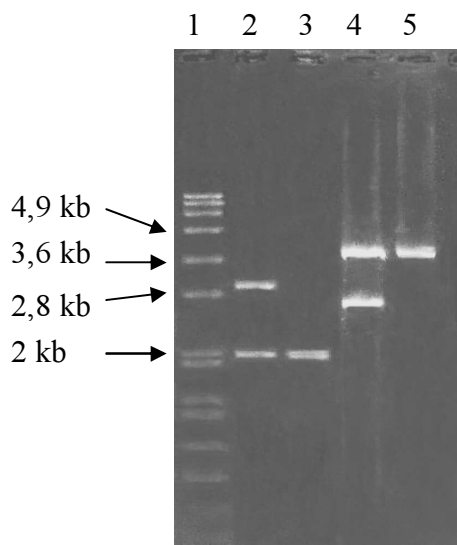
(1) DNA standard VII, (2) vektor pUC18 nedoštěpený s inzertem (7,7 kb), doštěpený (2,69 kb) a vyštěpený fragment fága 3A (5002 bp), (3) vyizolovaný fragment fága 3A

**Obr. 12.** Agarózová gelová elektroforéza znázorňující výsledek izolace fragmentu fága  $\Phi$ 13 z agarózového gelu



(1) DNA standard VII, (2) vyizolovaný fragment fága  $\Phi$ 13 (1061 bp), (3) vektor pBluescript nedoštěpený s inzertem (4,03 bp), doštěpený (2,96 kb) a vyštěpený fragment fága  $\Phi$ 13

**Obr. 13.** Agarózová gelová elektroforéza znázorňující výsledek izolace fragmentu fága 53 a 187 z agarózového gelu



(1) DNA standard VII, (2) vektor pBluescript (2,96 kb) a vyštěpený fragment fága 187 (1926 bp), (3) vyizolovaný fragment fága 187 (4) vektor pUC18 (2,69 kb) a vyštěpený fragment fága 53 (3924 bp), (5) vyizolovaný fragment fága 53

#### 4.4. Příprava směsi sond a její ověření

Izolované fágové fragmenty a PCR produkty a byly značeny Klenowovým enzymem prostřednictvím náhodných hexanukleotidů a DIG-11-dUTP. Z fragmentů a PCR produktů značených digoxigeninem byla připravena směs molekulárních sond. Metodou kapkové hybridizace byla ověřena funkčnost připravených sond. Fágové DNA, ze kterých byly připraveny sondy, byly nakapány na nylonovou membránu a hybridizovány se směsí sond. Pomocí kapkové hybridizace byly také vizuálně zhodnoceny koncentrace jednotlivých sond a podle potřeby upraveny. K dalšímu ověření připravených sond byla jejich směs hybridizována s *Hind*III restrikčními spektry fágových genomových DNA (obrázek 14). K hybridizaci byly použity některé fágy mezinárodní základní řady pro typizaci lidských kmenů *S. aureus*, fág 187 a fág  $\Phi$ 11. Fágy byly vybrány tak, aby co nejlépe reprezentovaly jednotlivé serologické skupiny, fágové druhy, lytické skupiny a morfologické skupiny (tabulka 4).

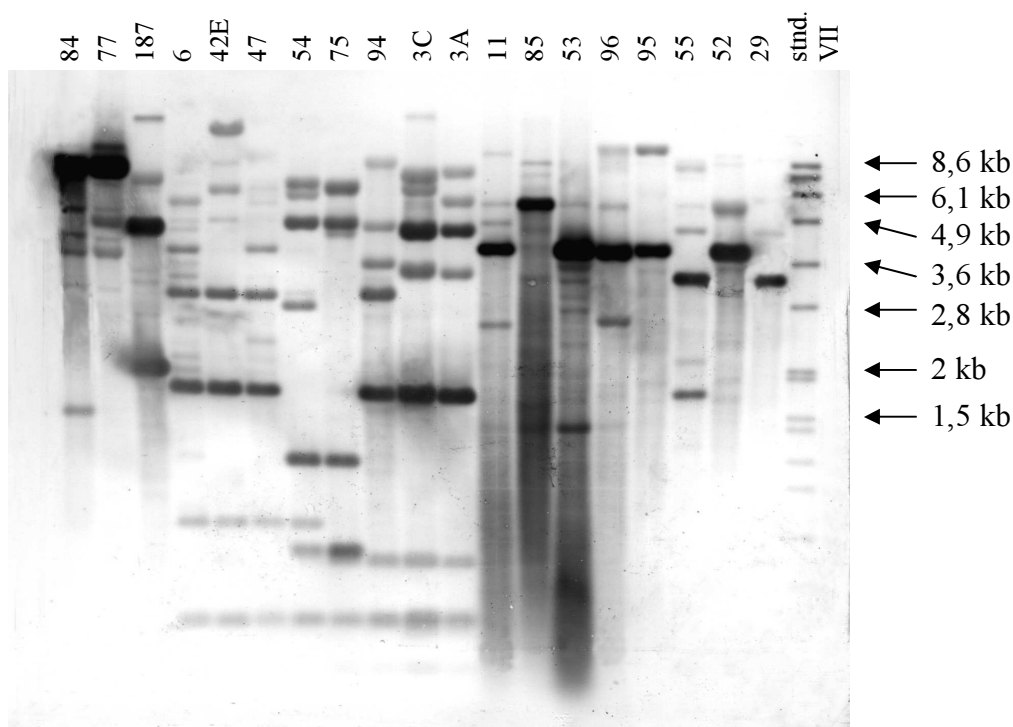
Z hybridizace fágových restrikčních spekter je zřejmá funkčnost směsi sond (obrázek 14). Dle očekávání však měly pro každého fága vzniknout tři až čtyři hybridizační signály (dvě univerzální sondy a jedna sonda specifická pro danou seroskupinu; další signál může vznikat v případě, že sekvence specifické sondy obsahuje příslušné restrikční místo). V tomto případě nicméně vznikaly také další signály, zřejmě v důsledku neúplného rozštěpení fágových DNA a cyklicky permutovaných genomů s koncovou redundancí u některých fágů.

U skupiny testovaných fágů nebylo získáno identické hybridizační spektrum u více fágů, což bylo v souladu s předpokladem využití sond pro typizační účely.

**Tab. 4.** Vlastnosti fágů, jejichž DNA byla hybridizována se směsí sond podle Asheshov 1967, Brandis a Lenz 1984, Marples a van Leeuwen 1987, Ackermann a DuBow 1987

Fág	Serologická skupina	Fágový druh	Lytická skupina	Morfologická skupina
84	F <sub>a</sub>	77	III	2.2.1 (B1)
77	F <sub>a</sub>	77	III	2.2.1 (B1)
187	L	187	smíšená	2.2.1 (B1)
6	A	3A	III	2.2.2 (B2)
42E	A	3A	III	2.2.2 (B2)
47	A	3A	III	2.2.2 (B2)
54	A	3A	III	2.2.2 (B2)
75	A	3A	III	2.2.2 (B2)
94	A	3A	IV	2.2.2 (B2)
3C	A	3A	II	2.2.2 (B2)
3A	A	3A	II	2.2.2 (B2)
Φ11	B	11	III	2.1 (B1)
85	B	11	III	2.2.1 (B1)
53	B	11	III	2.1 (B1)
96	B	-	IV	2.1 (B1)
95	B	-	smíšená	2.1 (B1)
55	B	-	II	2.1 (B1)
52	B	P11	I	2.1 (B1)
29	B	-	I	2.1 (B1)

**Obr. 14.** Hybridizace *Hind*III restrikčního spektra vybraných fágů se směsí sond

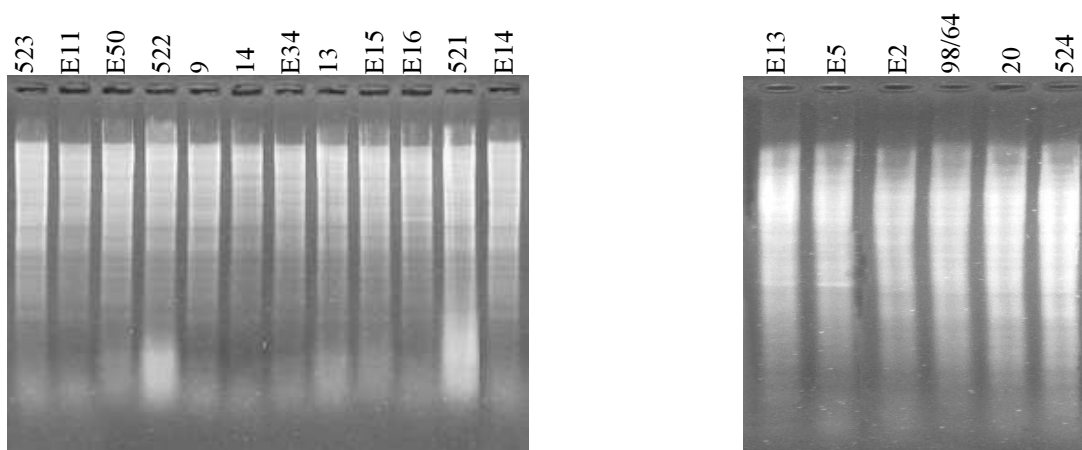


#### 4.5. Hybridizace restričních spekter bakteriálních genomových DNA se směsí sond

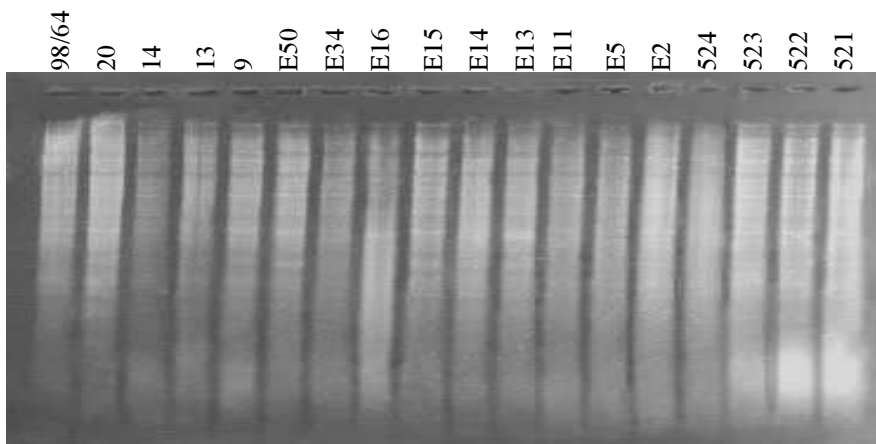
K hodnocení profágové typizace jako metody k odlišení blízce příbuzných kmenů *S. aureus* bylo vybráno 18 příbuzných epidemických meticilin resistantních nemocničních kmenů *S. aureus* z několika nemocnic v Praze a Brně (tabulka 9). K detekci RFLP polymorfismů byly zvoleny často štěpící restriční enzymy *Hind*III a *Cla*I (obrázek 15 a 16).

Po restričním štěpení následoval Southernův kapilární přenos restričních spekter na nylonovou membránu a hybridizace se směsí fágových sond (obrázek 17 a 18).

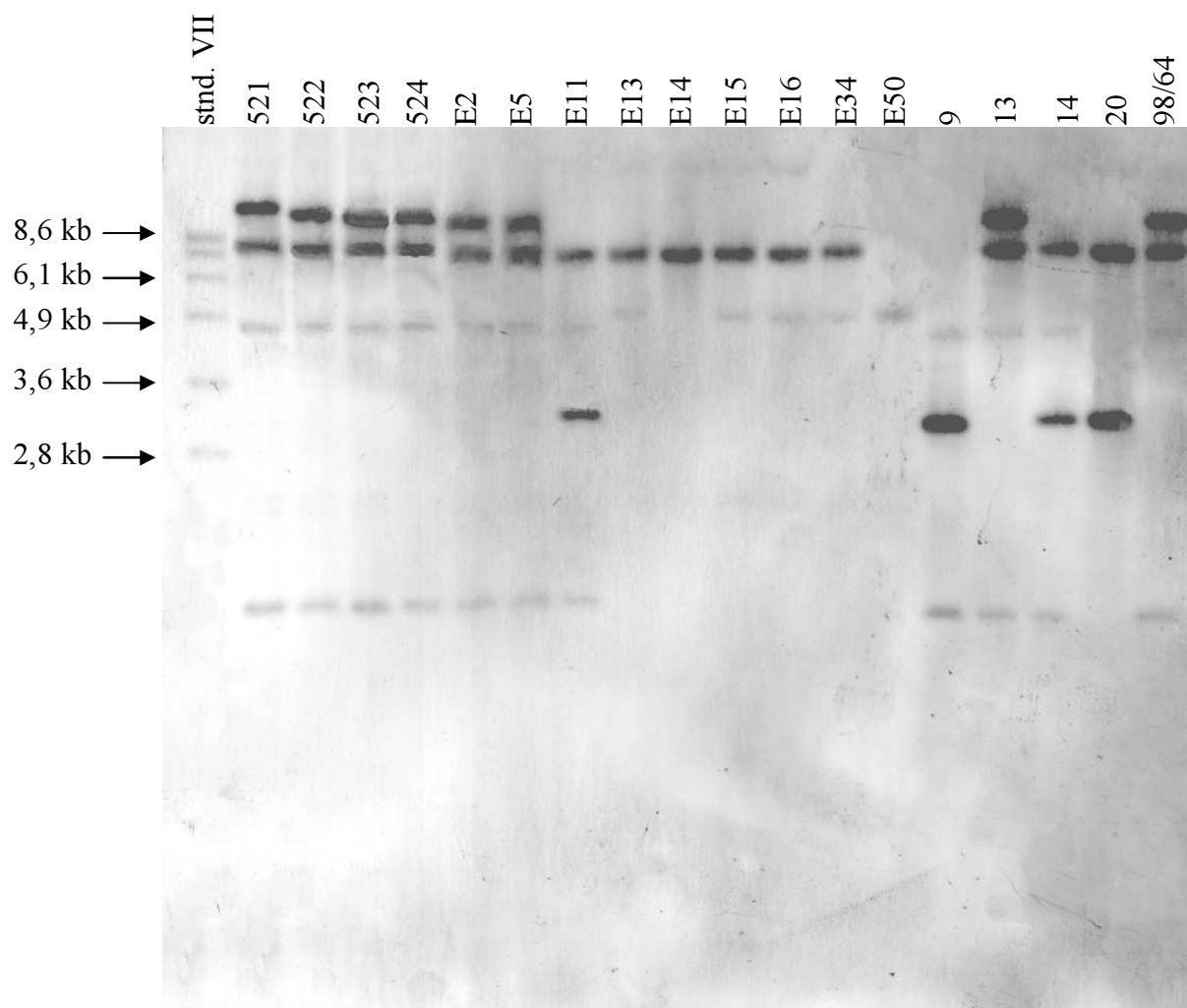
**Obr. 15.** Agarózová gelová elektroforéza s *Hind*III restričními spektry bakteriálních DNA kmenů *S. aureus*



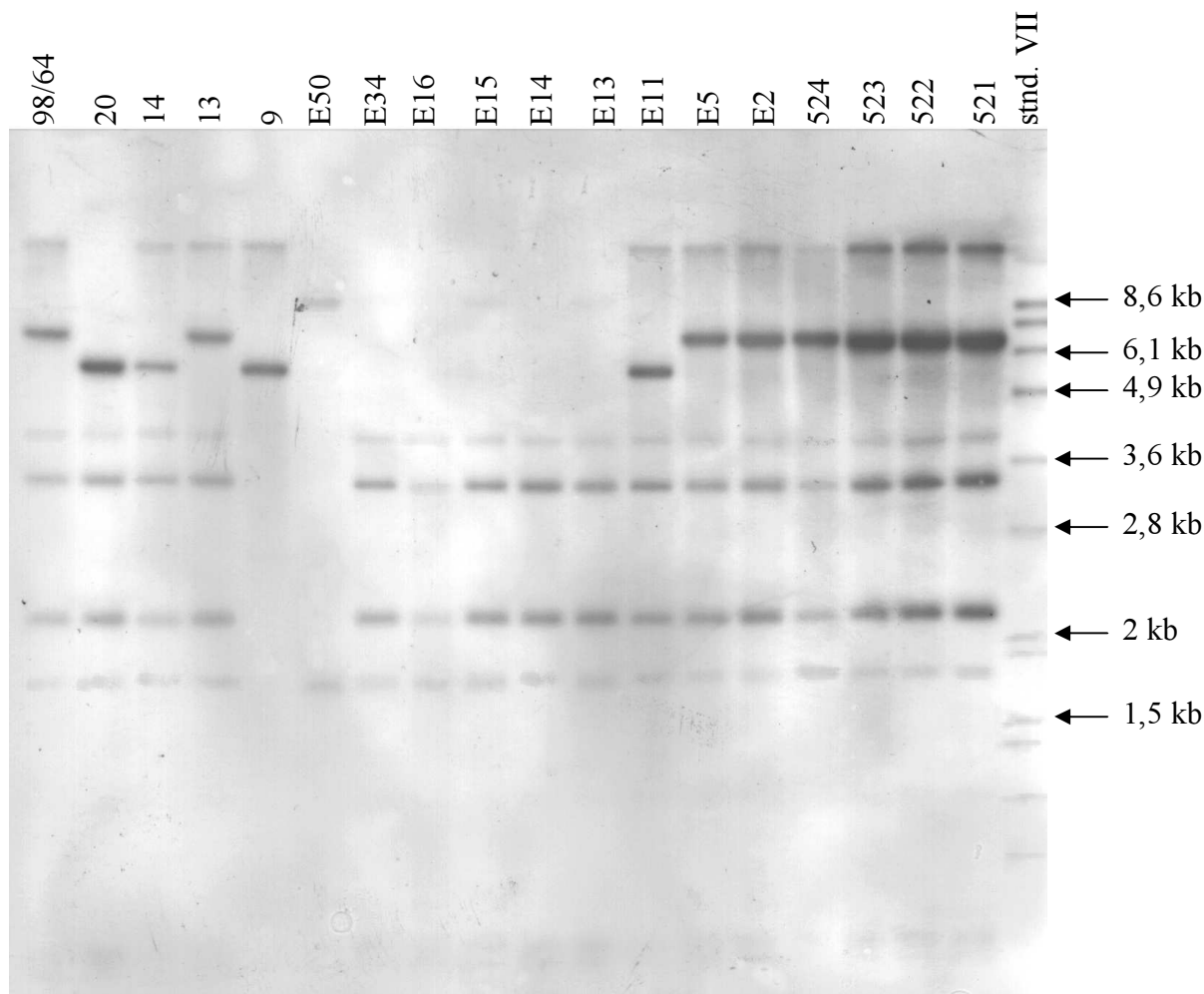
**Obr. 16.** Agarózová gelová elektroforéza s *Cla*I restričními spektry bakteriálních DNA kmenů *S. aureus*



**Obr. 17.** Hybridizace *Hind*III restrikčního spektra se směsí fágově specifických sond



**Obr. 18.** Hybridizace *Cla*I restrikčního spektra se směsí fágově specifických sond



#### **4.6. Hybridizace makrorestrikčních spekter bakteriálních DNA se směsí sond**

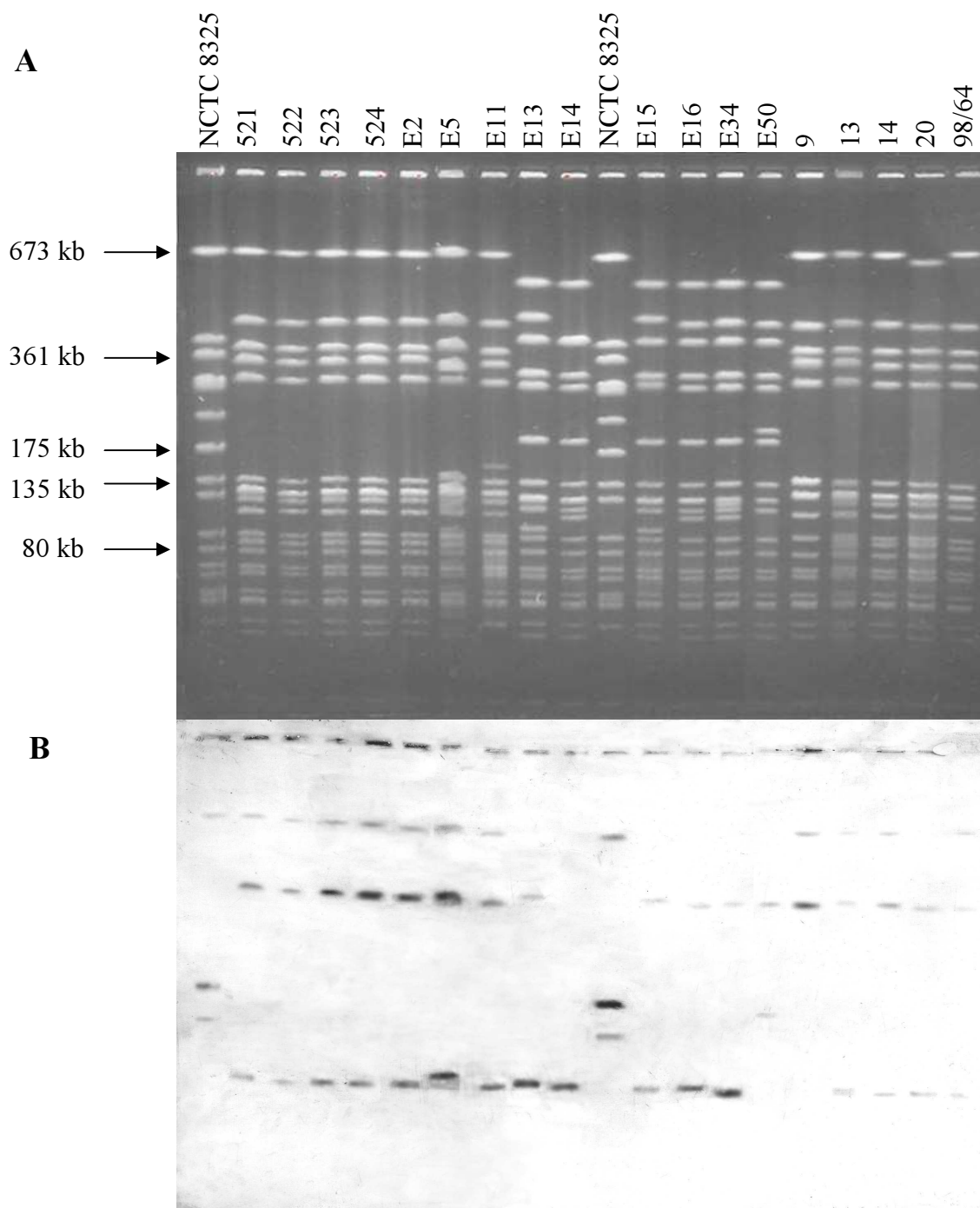
DNA výše zmíněných kmenů *S. aureus* byly štěpeny vzácně štěpicím restrikčním enzymem *Sma*I a podrobeny pulzní gelové elektroforéze (obrázek 19). Podmínky průběhu PFGE byly optimalizovány pro co nejefektivnější rozlišení jednotlivých fragmentů. Optimálními byly zvoleny pulzní časy 0,5 - 50 s po dobu 31 hodin. Jako standard velikosti byl použit kmen *S. aureus* NCTC 8325, velikost *Sma*I restrikčních fragmentů tohoto kmene byla určena podle práce Voborníková (2004).

Po Southernově přenosu restrikčních spekter na nylonovou membránu byla provedena jejich hybridizace se směsí fágových sond (obrázek 19).

**Obr. 19.**

**A)** Pulzní gelová elektroforéza genomových DNA kmenů *S. aureus* štěpených *Sma*I.

**B)** Hybridizace makrorestrikčních spekter se směsí fágově specifických sond



PFGE je standardně používanou metodou pro účely typizace *S. aureus*, proto bylo provedeno podrobné vyhodnocení makrorestrikční analýzy pro srovnání rozlišovací schopnosti obou použitých metod. Podle vzorů tvořených *Sma*I restrikčními fragmenty po rozdělení pomocí PFGE byl soubor kmenů rozdělen do 10 skupin a podskupin. Rozdílnými arabskými číslicemi jsou označeny kmeny se zřetelně odlišnými restrikčními spektry (změna v poloze 6 a více proužků). V rámci těchto skupin jsou rozlišeny podskupiny, které se liší v poloze alespoň jednoho proužku a jsou označeny malými písmeny (tabulka 5).

**Tab. 5.** Vzory restrikčních fragmentů (pulzní typy) po PFGE

Kmen	PFGE typ	Kmen	PFGE typ
521	1a – v1	E11	1d
522	1a – v1	E13	2e – v1
523	1a – v1	E15	2e – v1
524	1a – v1	E14	2m
E2	1a – v1	E16	2e – v2
13	1a – v1	E34	2f
14	1a – v1	E50	2h
98/64	1a – v1	9	1a – v2
E5	1c	20	1a – v3

#### 4.5. Výpočet typovatelnosti a rozlišovací síly

K výpočtu rozlišovací síly typizačních metod byl použit Simpsonův index diverzity (HUNTER a GASTON 1988, HUNTER 1990). Tento index závisí na počtu typů a na četnosti rozšíření kmenů každého typu a je dán vztahem:

$$D = 1 - \frac{1}{N(N - 1)} \sum_{j=1}^S n_j(n_j - 1)$$

kde  $D$  je diskriminační index,  $N$  je počet nepříbuzných testovaných kmenů,  $S$  je počet rozdílných typů a  $n_j$  je počet kmenů patřících k  $j$ -tému typu.



Hybridizací *Hind*III restrikčních spekter se směsí sond bylo zjištěno 7 profágových typů. Nejčastější typ 1 se vyskytuje v 8 případech, typ 2 ve 4 případech a typ 3 ve dvou případech. Typy 4, 5, 6 a 7 jsou zastoupeny každý jedním kmenem (tabulka 7).

Po dosažení do výše uvedeného vzorce byla zjištěna rozlišovací síla 0,771.

**Tab. 7.** Profágové typy kmenů *S. aureus* po hybridizaci *Hind*III RE spektra se směsí sond

Kmen	<i>Hind</i> III profágový typ	Kmen	<i>Hind</i> III profágový typ
521	1	E15	2
522	1	E16	2
523	1	E34	2
524	1	E11	3
E2	1	14	3
E5	1	E14	4
13	1	E50	5
98/64	1	9	6
E13	2	20	7

Po hybridizaci *Cla*I restrikčních spekter bakteriálních genomových DNA se směsí fágových sond byly analyzované kmeny rozděleny do 6 profágových typů. Nejhojněji je zastoupen typ 1, ke kterému náleží 8 kmenů, dále typ 2 s 5 zástupci, typ 3 se 2 zástupci a typy 5, 6 a 7 každý reprezentovaný 1 kmenem (tabulka 6).

Hodnota vypočítané rozlišovací síly je v tomto případě 0,745.

**Tab. 6.** Profágové typy kmenů *S. aureus* po hybridizaci *Cla*I RE spektra se směsí sond

Kmen	<i>Cla</i> I profágový typ	Kmen	<i>Cla</i> I profágový typ
521	1	E14	2
522	1	E15	2
523	1	E16	2
524	1	E34	2
E2	1	E11	3
E5	1	14	3
13	1	E50	5
98/64	1	9	6
E13	2	20	7

Číslování *Cla*I profágových typů je vztaženo k číslování *Hind*III typů, proto zde není zastoupeno číslo 4, jelikož kmen E14 náleží v tomto případě do profágového typu 2.

Hybridaze *SmaI* makrorestrikčního spektra po PFGE se směsí sond odhalila 6 profágových typů. Typ 1 je zastoupen 10 kmeny a typ 2, stejně jako typ 2A, je zastoupen 2 kmeny. Po jednom zástupci mají typy 2B, 4, 5 a 6 (tabulka 8).

Rozlišovací síla pro *SmaI* profágovou typizaci je 0,693. Naproti tomu rozlišovací síla vlastní pulzní gelové elektroforézy, vypočítaná na základě zastoupení jednotlivých pulzních typů podle tabulky 5, je 0,810.

**Tab. 8.** Profágové typy kmenů *S. aureus* po hybridizaci *SmaI* makroRE spektra se směsí sond

<b>Kmen</b>	<b><i>SmaI</i> profágový typ</b>	<b>Kmen</b>	<b><i>SmaI</i> profágový typ</b>
521	1	98/64	1
522	1	E13	2
523	1	E15	2
524	1	E16	2A
E2	1	20	2A
E5	1	E14	4
E11	1	E34	2B
13	1	E50	5
14	1	9	6

Číslování *SmaI* profágových typů je vztaženo k číslování *HindIII* typů. Proto jsou kmeny E16, 20 a E34, ač představují samostatné typy a nikoli podtypy, označeny jako 2A a 2B.

Typovatelnost metody je počítána jako podíl kmenů, které lze pomocí dané metody otypovat (ŠTĚPÁN aj. 2004). Ve všech případech profágové typizace provedené hybridizací v této práci byla zjištěna hodnota typovatelnosti 1, tzn. 100% typovatelnost, jelikož u každého kmene byl přítomen alespoň jeden hybridizační signál. 100% typovatelnost PFGE typizace vyplývá z podstaty této metody.

## 5. DISKUZE

Cílem této diplomové práce bylo zhodnotit, zda je metoda profágové typizace vhodná k rozlišení blízce příbuzných kmenů *S. aureus*.

Profágová typizace patří mezi genotypové typizační metody a jako taková využívá k rozlišení bakteriálních kmenů rozdílného obsahu profágů v genomech těchto kmenů. Současné metody k detekci profágů v lyzogenních kmenech zahrnují jejich indukci pomocí mitomycinu C nebo UV záření (BEARD-PEGLER a VICKERY 1985, WILKINSON aj. 1987). Tyto metody jsou však zdlouhavé a pracné a proto nevhodné pro rutinní testování kmenů v klinické praxi. Jejich alternativou je právě profágová typizace prostřednictvím molekulárních metod, která představuje perspektivní metodu s řadou výhod oproti metodám stávajícím. Kromě technické náročnosti je její podstatnou výhodou také schopnost detekovat v genomech bakterií defektní profágy neschopné excize, jejichž přítomnost nelze zjistit indukci.

Genotypové metody pro detekci profágů již byly popsány například u bakterií mléčného kvašení. Nejsou však využívány k typizaci bakteriálních kmenů, ale především k identifikaci fágů jako významných patogenů bakteriálních kultur mléčného průmyslu (O'SULLIVAN aj. 2000, LABRIE a MIONEAU 2000).

Metoda profágové typizace kmenů *S. aureus* byla vyvinuta na Oddělení genetiky a molekulární biologie MU. K detekci profágů využívá konzervativní sekvence genů pro strukturální proteiny fágových virionů společně zároveň pro fágové seroskupiny a fágové druhy. Je založena na dvou hlavních metodických přístupech. 1. Na hybridizaci restričních spekter genomových bakteriálních DNA s fágovými sondami, připravenými ze sekvencí specifických pro fágové seroskupiny/druhy (BORECKÁ aj. 1996, DOŠKAŘ aj. 2000). 2. Na multiplex PCR, kde jsou jednotlivé dvojice primerů připraveny z těchto specifických sekvencí (PANTŮČEK aj. 2004).

K hodnocení metody profágové typizace byl v této práci použit první metodický přístup, totiž selektivní hybridizace restričních spekter bakteriálních DNA se směsí sond. Oproti předchozím pracím (BORECKÁ aj. 1996, DOŠKAŘ aj. 2000), je však návrh tohoto experimentu odlišný v následujících bodech:

K přípravě sond specifických pro fágové seroskupiny/druhy byly použity dříve naklonované fágové fragmenty (serologické skupiny A, B, F<sub>a</sub> a L), ale navíc také v této práci naklonovaný fragment fága  $\Phi$ 13 (serologická skupina F<sub>b</sub>). Ze sekvencí společných všem

mírným bakteriofágům *S. aureus* byly dále připraveny dvě univerzální sondy, sloužící k detekci profágů obecně.

Všechny sondy byly značeny pouze jedním barvivem – digoxigeninem a k hybridizaci restrikčních spekter byly použity ve směsi. Proto nebyly detekovány fágy jednotlivých serologických skupin, ale konzervativní sekvence všech profágů jejichž souhrn tvoří profágový profil kmene. Kromě toho byla cílem detekce polymorfismu v délce restrikčních fragmentů (RFLP), způsobená přítomností či nepřítomností restrikčních míst v genomu profágů, zviditelněná hybridizací se směsí fágových sond. Jako výsledek byl očekáván fingerprint hybridizačních signálů, charakteristický pro daný kmen. Kmeny se shodným fingerprintem pak tvoří jeden společný typ.

Prvním krokem této práce bylo vyhledání sekvencí k přípravě fágových sond, srovnáváním osekvenovaných fágových genomů *in silico*.

Dosud chybějící sekvence specifická pro serologickou skupinu F<sub>b</sub> byla vyhledána srovnáním pěti osekvenovaných genomů fágů této skupiny. Nalezená sekvence je velikosti asi 3700 bp a zahrnuje část modulu sbalování a strukturního modulu hlavy fága Φ13: gen pro malou podjednotku terminázy – sekvence podobná ORF3 fága PVL – gen pro portálový protein – gen pro kapsidovou proteázu. Tento výsledek je ve shodě s faktem, že sekvence, použitá pro přípravu sondy specifické pro serologickou skupinu F<sub>a</sub>, se nachází na přibližně stejném místě genomu fága 77 a obsahuje geny modulu pro sbalování DNA (PANTŮČEK aj. 2004). K amplifikaci nalezené sekvence Φ13 byly navrženy PCR-primery, které v této sekvenci ohraničují část genu pro portálový protein a genu pro kapsidovou proteázu o velikosti 1258 bp.

K vyhledání univerzálních fágových sekvencí bylo srovnáno 17 sekvencí fágových genomů. Byly zjištěny čtyři konzervativní sekvence: 57 bp velká nekódující oblast mezi genem pro integrázu a excisionázu, 178 bp oblast homologní k ORF38 fága PVL, 125 bp oblast homologní k části genu *rinB* fága Φ11 a 60 bp nekódující oblast před genem pro holin. Oblast mezi genem *int* a *xis* vykazovala největší homologii mezi srovnávanými fágy (97 %) avšak zároveň šlo o nejkratší z vyhledaných sekvencí, jejíž délka není dostatečná k přípravě molekulární sondy. Proto byly k přípravě univerzálních sond vybrány dvě nejdelší sekvence: oblast homologní k ORF38 fága PVL (89% homologie mezi srovnávanými fágy) a oblast homologní ke genu *rinB* fága Φ11 (87% homologie). Funkce ORF38 není známa, u fágů Φ11 Φ12 a Mu50B však představuje nekódující oblast (PANTŮČEK aj. 2004). *rinB* kóduje transkripční aktivátor RinB, který reguluje transkripci genu pro integrázu (YE a LEE 1993).

PCR-primery ohraničují v sekvenci ORF38 oblast o velikosti 119 bp, v genu *rinB* oblast o velikosti 126 bp (velikost PCR produktu je 138 bp, jelikož je prodloužena o 5' modifikované konce PCR-primerů). V obou případech však sekvence zpětného primeru z části zasahuje mimo oblast vyhledané 89% a 87% homologie.

Dalším krokem bylo klonování PCR produktů vyhledaných sekvencí do vektoru pBluescript. PCR produkt fága  $\Phi$ 13 byl štěpen restričními enzymy *SalI* a *SacI* a tento fragment byl naklonován. V sekvencích *rinB* a ORF38 však nebyla přítomna vhodná restriční místa a proto byla jejich sekvence začleněna do sekvence PCR-primerů. Takto vzniklý *EcoRI* - *XbaI* fragment genu *rinB* byl naklonován. V případě sekvence ORF38 však klonování nebylo úspěšné, přestože byla navržena alternativní sada primerů se sekvencemi odlišných restričních míst, a přestože modrobílý test vykazoval pozitivní výsledky. Úspěšně naklonovat sekvenci ORF38 se podařilo až ligací neštěpených PCR produktů s vektorem štěpeným restriktázou *SmaI*, která tvoří tupé konce.

Naklonované sekvence pak měly sloužit k přípravě molekulárních sond. Sekvenci ORF38 a *rinB* se však nepodařilo vyizolovat s agarózového gelu v dostatečné koncentraci v důsledku jejich malých velikostí (119 bp respektive 138 bp). Proto byly k přípravě univerzálních sond použity PCR produkty. Z DNA označených digoxigeninem byla připravena směs fágových sond.

K provedení profágové typizace pomocí hybridizace se směsí připravených sond byl vybrán soubor 18 nemocničních kmenů *S. aureus* získaných z Fakultní nemocnice v Brně-Bohunicích a z několika nemocnic v Praze. Ve všech případech jde o epidemické nosokomiální kmeny resistentní k met icilinu (oxacilinu). Jejich vzájemnou příbuznost ukazují test citlivosti k antibiotikům a fagotypizace, ale také řada genotypových metod, které byly na tomto souboru aplikovány:

- profágová typizace prostřednictvím multiplex PCR
- RAPD
- PFGE-typizace
- ribotypizace
- SCCmec–typizace
- restriční analýza plazmidů

Příbuznost kmenů lze odvodit také z místa a data jejich izolace (tabulka 9). Uvedené výsledky typizačních metod dále slouží jako srovnání k hodnocení rozlišovací síly profágové typizace provedené v této práci.

**Tab. 9.** 18 kmenů *S. aureus* a jejich původ a vlastnosti

Kmen	Místo izolace	Oddělení	Datum izolace	Vyšetření	Antibiogram														FAGOTYPIZACE	Genotyp						
					OXA	MUP	ERY	CLI	COT	RIF	CIP	GEN	TEI	VAN	FUS	CMP	LNZ	AMC		TET	Profágový profil (PCR)	RAPD	PFGE <i>Sma</i> I	Ribotypizace	SSC <i>mec</i> typ	Plazmidy
9	Praha		96	hemokultura	R	C	R	R	R	R	R	R	C	C	C	C	C	R	R	NT	AB	R1	1e-v2	4	Brazilský (IIIa)	N
521	Brno - Bohunice	POP	97	stěr	R	C	R	R	R	C	R	R	C	C	C	C	C	R	R	NT	ABFa-	R1	1a-v1	1	Brazilský (IIIa)	N
522	Brno - Bohunice	POP	97	ven. katetr	R	C	R	R	R	C	R	R	C	C	C	C	C	R	R	NT	ABFa-	R1	1a-v1	1	Brazilský (IIIa)	N
523	Brno - Bohunice	POP	97	stěr	R	C	R	R	R	C	R	R	C	C	C	C	C	R	R	NT	ABFa-	R1	1a-v1	4	Brazilský (IIIa)	N
524	Brno - Bohunice	POP	97	hemokultura	R	C	R	R	R	C	R	R	C	C	C	C	C	R	R	NT	ABFa-	R1	1a-v1	4	Brazilský (IIIa)	N
13	Praha		97	stěr z rány	R	C	R	R	R	C	R	R	C	C	C	C	C	R	R	NT	ABFa-	R2	1a-v1	1	Brazilský (IIIa)	N
14	Praha		97	redon	R	C	R	R	R	C	R	R	C	C	C	C	C	R	R	NT	ABFa-	R3	1a-v1	1	Brazilský (IIIa)	N
20	Praha		97	stěr z rány	R	C	R	R	R	C	R	R	C	C	C	C	C	R	R	85	ABFa-	R4	1a-v3	1	Brazilský (IIIa)	N
98/64	Brno - Bohunice	chirurgie	16.1.1998	hnis z rány	R	C	R	R	R	C	R	R	C	C	C	C	C	R	R	85	ABFa-	R1	1a-v1	1	Brazilský (IIIa)	N
E2	Brno - Bohunice	POP-JIP	15.11.99	l.rameno-miska	R	R	R	R	R	C	R	R	C	C	C	C	C	R	C	42E, 85	ABFa-	R1	1a-v1	1	Brazilský (IIIa)	N
E5	Brno - Bohunice	POP-odd.stand.+IMP	27.12.99	stěr z rány	R	C	R	R	R	C	R	R	C	C	C	C	C	R	R	85	ABFa-	R1	1c	1	Brazilský (IIIa)	N
E11	Brno - Bohunice	POP-odd.stand. F	11.4.00	mater. na drenu	R	C	R	R	R	C	R	R	C	C	C	C	C	R	R	85	ABFa-	R1	1d	1	Brazilský (IIIa)	N
E14	Brno - Bohunice	POP-odd.stand. F	5.12.00	stěr z rány	R	C	R	C	C	R	R	R	C	C	C	C	C	R	R	NT	--Fa	R2	2m		Český (III)	IIIb
E13	Brno - Bohunice	POP-odd.stand. F	2.1.01	stěr z rány	R	C	R	R	C	R	R	R	C	C	C	C	C	R	R	NT	--FaFb	R2	2e-v1		Český (III)	IIIb
E15	Brno - Bohunice	POP-odd.stand. F	3.1.01	stěr z rány	R	C	R	R	C	R	R	R	C	C	C	C	C	R	R	NT	--FaFb	R3	2e-v1		Český (III)	IIIb
E16	Brno - Bohunice	POP-F-JIP	5.2.01	stěr z rány	R	C	R	R	C	R	R	R	C	C	C	C	C	R	R	NT	--FaFb	R3	2e-v2		Český (III)	IIIb
E34	Brno - Bohunice	KPRCH-F-JIP	23.8.02	výtěr-kanyla	R	C	R	C	C	R	R	R	C	C	C	C	C	R	R	NT	---Fb	R2	2f		Český (III)	IIIa
E50	Brno - Bohunice	ORL-amb.	26.3.02	výtěr z nosu	R	C	R	C	C	R	R	R	C	C	C	C	C	R	R	NT	---Fb	R2	2h		Český (III)	IIIa

Antibiotika: Oxa - Oxacilin, Mup - Mupirocin, Ery - Erytromycin, Cli - Klindamycin, Cot - Kotrimoxazol, Rif - Rifampicin, Cip - Ciprofloxacín, Gen - Gentamicin, Tei - Teikoplanin, Van - Vankomycin, Fus - Fusidová kyselina, Cmp - Chloramfenikol, Lnz - Linkozamid, Amc - Ampicilin, Tet - Tetracyklin

Antibiogram, fagotypizace, PCR profágový profil a RAPD: data převzata z Růžičková aj. (2006)

PFGE *Sma*I: stanoven v této práci

Ribotypizace: Sedláček a Švec (1999)

SSC*mec* typizace: Voborníková (2004)

Plazmidy: Kuntová (2006)

Následoval výběr vhodného restriktivního enzymu k detekci polymorfismů restriktivních spekter bakteriálních kmenů. Za tímto účelem byly vybrány často štěpící restriktivní enzymy *HindIII* a *ClaI*.

Větší rozlišovací síla byla předpokládána u hybridizace *HindIII* restriktivního spektra, jelikož *HindIII* je z této dvojice častěji štěpící. Tento předpoklad se potvrdil, výsledná rozlišovací síla podle Simpsonova indexu diverzity (HUNTER a GASTON 1988, HUNTER 1990) byla pro hybridizaci *HindIII* spektra 0,771 a pro hybridizaci *ClaI* spektra 0,745. Rozdíl je však minimální a je za něj zodpovědné pouze vyčlenění kmene E14 jako samostatného typu u *HindIII* hybridizace, díky kterému zde bylo identifikováno 7 typů namísto 6 u *ClaI* hybridizace (tabulka 10).

V obou případech byla zjištěna 100% typovatelnost, vzhledem k tomu, že pro každý kmen byl viditelný alespoň jeden hybridizační signál. Toto zjištění bylo ve shodě s předpoklady, jelikož z profágových profilů těchto kmenů vyplývá, že každý z nich nese v genomu alespoň jednoho profága.

**Tab. 10.** Srovnání *ClaI* a *HindIII* profágových typů

Kmen	<i>ClaI</i> typ	<i>HindIII</i> typ	Kmen	<i>ClaI</i> typ	<i>HindIII</i> typ
521	1	1	E14	2	4
522	1	1	E15	2	2
523	1	1	E16	2	2
524	1	1	E34	2	2
E2	1	1	E11	3	3
E5	1	1	14	3	3
13	1	1	E50	5	5
98/64	1	1	9	6	6
E13	2	2	20	7	7

Dalším krokem bylo provedení pulzní gelové elektroforézy po restriktivním štěpení bakteriálních genomů vzácně štěpící restriktázou *SmaI*. PFGE je považována za typizační metodu *S. aureus*, která celkově nejlépe splňuje kritéria pro posuzování typizačních systémů jako je reprodukovatelnost nebo rozlišovací síla (MASLOW a MULLIGAN 1996, TENOVER aj. 1997). Cílem bylo jednak ověření dříve provedené PFGE na souboru těchto kmenů, ale především hybridizace makrorestriktivního spektra se směsí připravených fágových sond.

Oproti předchozí PFGE bylo v této práci zjištěno několik změn v pulzních typech. Mezi kmeny původně přiřazenými k pulznímu podtypu 1a jsou podle výsledků této práce odlišné dva kmény náležející k jiným podtypům. Jde o kmény 9 a 20; u obou je oproti podtypu 1a

zřetelně viditelná změna v jednom proužku. Tyto kmeny byly označeny jako podtypy 1a – v2 a 1a – v3, zatímco zbylé kmeny původního podtypu 1a byla označeny jako 1a – v1. Obdobná situace byla zjištěna u kmenů E13 a E16, které mají náležet k podtypu 2e, nicméně je mezi nimi zřejmá změna dvou proužků. Proto byly označeny jako podtypy 2e – v1 a 2e – v2. Vzor restričních fragmentů kmene E15, který byl klasifikován jako podtyp 2g, se ukázal shodným s restričním vzorem kmene E13, proto byl přiřazen ke stejnému podtypu jako tento kmen, tzn. 2e – v1.

Po hybridizaci makrorestričního spektra se směsí sond bylo možné porovnat rozdíly v přiřazení kmenů k pulzním typům oproti profágovým typům. Z tabulky 11 je zřejmé, že kmeny tří rozdílných pulzních podtypů 1a – v1, 1c a 1d byly na základě hybridizace přiřazeny do jediného profágového typu 1. Dalším rozdílem je přiřazení rozdílných pulzních typů 2e – v2 a 1a – v3 ke stejnému profágovému typu 2A. Hybridizace makrorestričního spektra tudíž neodhalila další rozdíly v jednotlivých pulzních typech, naopak sloučila rozdílné pulzní typy do stejných profágových typů. To se odráží také v hodnotách rozlišovací síly, která je pro PFGE-typizaci 0,810, zatímco pro *SmaI* profágovou typizaci pouze 0,693. Proto lze hybridizaci makrorestričního spektra se směsí fágových sond doporučit pouze jako doplňující metodu k PFGE. Na jejím základě je možné rozeznat, které rozdíly v poloze restričních fragmentů mezi dvěma kmeny jsou způsobeny začleněním/ztrátou profága (BORECKÁ aj. 1996).

**Tab. 11.** Srovnání *SmaI* pulzních typů a *SmaI* profágových typů

Kmen	<i>SmaI</i> PFGE typ	<i>SmaI</i> prof. typ	Kmen	<i>SmaI</i> PFGE typ	<i>SmaI</i> prof. typ
521	1a – v1	1	E11	1d	1
522	1a – v1	1	E13	2e – v1	2
523	1a – v1	1	E15	2e – v1	2
524	1a – v1	1	E14	2m	4
E2	1a – v1	1	E16	2e – v2	2A
13	1a – v1	1	E34	2f	2B
14	1a – v1	1	E50	2h	5
98/64	1a – v1	1	9	1a – v2	6
E5	1c	1	20	1a – v3	2A

Celkové srovnání rozdílných typů u hodnocených kmenů znázorňuje tabulka 12. Nejhojněji se mezi srovnávanými 18 kmeny vyskytoval profágový typ 1, kterému odpovídá pulzní typ 1a – v1. Jedná se o kmeny brazilského klonu MRSA izolované v letech 1997- 1999 ve FN v Brně: 521, 522, 523, 524, 98/64, E2 a kmen E5, který vykazuje profágový typ 1, ale pulzotyp 1c. Do kategorie profágový typ 1/pulzní typ 1a – v1 spadá rovněž pražský kmen 13



z roku 1997. Pražský kmen 14 sice také náleží k pulznímu typu 1a – v1, nicméně *HindIII* a *ClaI* profágová typizace jej vydělili spolu s brněnským kmenem E11 jako odlišný typ. Srovnáme-li *HindIII* profágové typy (nejvyšší rozlišovací síla mezi metodami profágové typizace) a pulzotypy ostatních kmenů, najdeme dva další rozdíly, totiž vydělení kmenů E16 a E34, které jsou klasifikovány jako profágový typ 2, do samostatných pulzních podtypů 2e – v2 a 2f. Z celkového srovnání výsledků v tabulce 12 je zřejmá poměrně dobrá korelace mezi jednotlivými metodami profágové typizace a PFGE typizací, která se projevuje řazením kmenů do analogických skupin – typů.

Zajímavé je srovnání *HindIII* profágové typizace s výsledky PCR profágové typizace uvedenými v tabulce 9. Z 11 kmenů se shodným profágovým profilem ABF<sub>a</sub> byly kmene E11, 14 a 20 identifikovány jako odlišné *HindIII* profágové typy (E11 a 14 jako stejný typ). Na druhou stranu však byl kmen E34 s profágovým profilem F<sub>b</sub> přiřazen podle *HindIII* hybridizace ke 3 kmenům s profágovým profilem F<sub>a</sub> F<sub>b</sub>.

**Tab. 12.** Srovnání *ClaI* a *HindIII* profágových typů a PFGE typů

Kmen	<i>ClaI</i> profág. typ	<i>HindIII</i> profág. typ	<i>SmaI</i> profág. typ	<i>SmaI</i> PFGE typ
521	1	1	1	1a – v1
522	1	1	1	1a – v1
523	1	1	1	1a – v1
524	1	1	1	1a – v1
E2	1	1	1	1a – v1
E5	1	1	1	1c
13	1	1	1	1a – v1
98/64	1	1	1	1a – v1
E13	2	2	2	2e – v1
E14	2	4	4	2m
E15	2	2	2	2e – v1
E16	2	2	2A	2e – v2
E34	2	2	2B	2f
E11	3	3	1	1d
14	3	3	1	1a – v1
E50	5	5	5	2h
9	6	6	6	1a – v2
20	7	7	2A	1a – v3

Podle tabulky 9 byla vypočítána rozlišovací síla a typovatelnost 7 rozdílných typizačních metod, které byly na soubor 18 hodnocených kmenů *S. aureus* aplikovány dříve. Vypočítané hodnoty byly srovnány s hodnotami pro *HindIII*, *ClaI* a *SmaI* profágovou typizací a PFGE typizací, které byly provedeny v této práci (tabulka 13).

Nevyšší rozlišovací sílu ze všech uvedených metod vykazuje typizace pomocí pulzní gelové elektroforézy, která dosahuje hodnoty 0,810. Za ní následují profágová typizace pomocí hybridizace *Hind*III restrikčního spektra a *Cla*I restrikčního spektra s hodnotami 0,771 a 0,745.

**Tab. 13.** Srovnání rozlišovací síly a typovatelnosti pro 11 typizačních metod *S. aureus*

	Metoda	Počet typů	Počet kmenů v jednotlivých typech	Rozlišovací síla	Typovatelnost
Fenotyp	Antibiogram	5	10;4;3;1;1	0,647	1
	Fagotyp	3	13;4;1	0,451	0,278
Genotyp	Profágový profil PCR	5	11;3;2;1;1	0,614	1
	RAPD	4	9;5;3;1	0,680	1
	PFGE <i>Sma</i> I	10	8;2;1;1;1;1;1;1;1;1	0,810	1
	Ribotyp *	2	9;3	0,410	1
	SCC <i>mec</i> typ	2	12;6	0,471	1
	Plazmidy	3	12;4;2	0,523	0,333
	<i>Hind</i> III prof. typizace	7	8;4;2;1;1;1;1	0,771	1
	<i>Cla</i> I profág. typizace	6	8;5;2;1;1;1	0,745	1
	<i>Sma</i> I profág. typizace	7	10;2;2;1;1;1;1	0,693	1

\* typováno pouze 12 z 18 kmenů

Celkově lze konstatovat, že metoda profágové typizace hybridizací restrikčních spekter často štěpících restriktáz se směsí fágových sond má podle očekávání Hybridizace makrorestrikčního spektra je vhodná jako doplnění PFGE typizace a umožňuje identifikovat vliv lyzogenie přímo na makrorestrikční spektrum DNA, na což poukázali již Smeltzer aj. (1994) a Borecká aj. (1996).

V této práci byla potvrzena 100% typovatelnost profágové typizace. Velmi vysoká typovatelnost profágové typizace je zřejmě jev obecného charakteru - 100% typovatelnost je doložena u souboru 176 kmenů *S. aureus* v práci Pantůček aj. 2004.

Pantůček aj. 2004 předpokládají víceméně srovnatelnou citlivost PCR profágové typizace a profágové typizace pomocí hybridizace. Profágová typizace pomocí hybridizace však má tu výhodu, že v genomu bakterie odliší přítomnost více profágů jedné serologické skupiny. Tento předpoklad se potvrdil a demonstruje jej asi o 9 % vyšší rozlišovací síla profágové typizace pomocí hybridizace než u PCR-typizace.

Nejnižší rozlišovací sílu má v tomto případě ribotypizace, tento výsledek je však oproti ostatním výsledkům zkreslený. Ribotypizace totiž nebyla provedena na všech 18 kmenech, ale pouze na 12 z nich. Tyto kmeny navíc tvoří v rámci celého souboru skupinu relativně

příbuznějších kmenů (všechny vykazují stejný pulzní typ 1). I přes toto zkruslení se však zdá, že ribotypizace zřejmě není příliš vhodnou metodou k odlišení blízkce příbuzných kmenů *S. aureus*. Může být nicméně použita k odlišení klonů vzájemně nepříbuzných kmenů, jak prokázali například Melter aj. (1999). Ve své práci pomocí ribotypizace úspěšně odlišili iberský, brazilský a český typ MRSA kmenů z českých nemocnic. Naproti tomu Chesneau aj. (2000) považují ribotypizaci za metodu vhodnou k odlišení druhů v rámci rodu *Staphylococcus*, nikoliv však za příliš vhodnou k odlišení nižších taxonů.

Nízká rozlišovací síla fagotypizace souvisí s velmi nízkou typovatelností této metody (28 %). Ta je dána nízkou citlivostí zkoumaných kmenů k infekci fágy mezinárodní řady, jejíž příčinou by mohla být imunitní exkluze u lyzogenů. Nízkou typovatelnost (36 %) MRSA kmenů dokládá také práce Vidhani aj. (2001), kteří zároveň poukazují na významný pokles typovatelnosti MRSA kmenů *S. aureus* v posledních letech. Jisté zlepšení typovatelnosti fagotypizace může podle této práce přinést užití odlišné sady bakteriofágů – fágů k typizaci MRSA kmenů *S. aureus*.

Podobná souvislost mezi typovatelností a rozlišovací silou existuje také v případě plazmidové typizace. Nízká typovatelnost plazmidové typizace (33 %) je způsobena tím, že výše zmíněná skupina 12 kmenů postrádá plazmidy. Takto nízká hodnota ovšem není typická pro plazmidovou typizaci MRSA kmenů *S. aureus*. Trilla aj. (1993) uvádějí na svém souboru MRSA kmenů 89% typovatelnost a Sekiguchi aj. (2004) dokonce 97% typovatelnost plazmidové typizace, což svědčí o skutečnosti, že dochází ke změně v obsahu plazmidů u současných virulentních klonů.

Z výše uvedeného vyplývá, že metoda profágové typizace pomocí hybridizace se zdá být vhodná k rozlišení blízkce příbuzných kmenů *S. aureus*. K přesnějšímu hodnocení a zavedení metody do praxe by však bylo potřeba provést další experimenty na rozsáhlejší souboru kmenů *S. aureus*. Profágová typizace pomocí hybridizace je technicky i časově náročnější než profágová typizace pomocí multiplex PCR. Značné zjednodušení v tomto směru by však mohla přinést technologie DNA mikročipů, založená na DNA – DNA hybridizaci. Profágová typizace pomocí DNA mikročipů se jeví jako velice perspektivní metoda k přesné a standardizované typizaci *S. aureus*. Výhodou je také její schopnost informovat o patogenitě kmenů, vzhledem k množství genů pro faktory virulence nesených fágovými genomy.

## 6. ZÁVĚR

Cílem této práce bylo hodnocení metody profágové typizace provedené pomocí selektivní hybridizace se směsí fágových sond, ve smyslu její použitelnosti k typizaci blízké příbuzných kmenů *S. aureus* a její srovnání se stávajícími typizačními metodami.

Nejdříve byla připravena směs profágově specifických hybridizačních sond značených digoxigeninem. Za tímto účelem byla identifikována a naklonována sekvence specifická pro fágovou seroskupinu F<sub>b</sub> (fágový druh 77) a dvě univerzální fágové sekvence. Kromě nich byly k přípravě molekulárních sond použity také dříve naklonované sekvence specifické pro ostatní fágové seroskupiny (A, B, F<sub>a</sub> a L) respektive druhy (3A, 11, 77 a 187).

Směs fágově specifických sond byla hybridizována s *Hind*III a *Cla*I restričními spektry 18 příbuzných epidemických meticilin resistantních nemocničních kmenů *S. aureus* z několika nemocnic v Praze a Brně. Po zhodnocení výsledných DNA fingerprintů byla zjištěna 100% typovatelnost pro obě hybridizace a srovnatelné, poměrně vysoké hodnoty rozlišovací síly (77 % respektive 75 %).

Dalším krokem bylo provedení pulzní gelové elektroforézy. Výsledné *Sma*I makrorestriční spektrum bylo nejprve podrobena RFLP analýze a poté hybridizováno se směsí fágově specifických sond. Typovatelnost profágové typizace pomocí *Sma*I hybridizace byla opět 100 %, zatímco rozlišovací síla 69 % byla o něco nižší než u předchozích hybridizací. Typizace pomocí PFGE se ukázala být metodou s nejvyšší rozlišovací silou 81 %, což je však výsledek srovnatelný s typizací pomocí *Hind*III hybridizace se směsí fágově specifických sond.

Výše uvedené hodnoty typovatelnosti a rozlišovací síly byly srovnány s výsledky sedmi dalších typizačních metod, provedených na stejném souboru kmenů (test citlivosti k antibiotikům, fagotypizace, profágová typizace prostřednictvím multiplex PCR, RAPD, ribotypizace, SCCmec–typizace, restriční analýza plazmidů).

100% typovatelnost vykazovaly kromě plazmidové typizace a fagotypizace také všechny ostatní metody. Ze srovnání všech typizačních metod vykazaly nejvyšší rozlišovací sílu metody provedené v této práci v pořadí: PFGE–typizace, *Hind*III profágová typizace, *Cla*I profágová typizace a *Sma*I profágová typizace.

Na základě dosažených výsledků lze konstatovat, že metoda profágové typizace pomocí hybridizace se jeví jako vhodná typizační metoda k rozlišení blízké příbuzných kmenů *S. aureus*. Typovatelnost pomocí této metody je 100 % a její rozlišovací síla je srovnatelná s rozlišovací silou PFGE–typizace.

## 7. SUMMARY

### **Molecular typing of *Staphylococcus aureus* based on the detection of polymorphisms in prophages.**

The aim of this work was to evaluate the potential of hybridization-based prophage typing as a method for typing of closely related strains of *Staphylococcus aureus*.

The first part of the work included preparation of digoxigenin labeled, phage specific hybridization probes. For this purpose, serological group F<sub>b</sub> (phage species 77) specific sequence and two universal phage sequences were identified and cloned. These were used for the preparation of molecular probes, together with the previously cloned phage sequences specific for other phage serological groups (A, B, F<sub>a</sub> a L) and/or phage species (3A, 11, 77 and 187 respectively).

The probes were mixed and hybridized with *Hind*III and *Cla*I restriction endonuclease patterns of 18 related epidemic methicillin-resistant hospital strains of *S. aureus* isolated in several hospitals in Brno and Praha. Resulting fingerprints were evaluated. Both hybridizations gave 100% typeability and their discriminatory powers were relatively high and similar to each other (77% and 75% respectively).

Next, pulse field gel electrophoresis was performed. Resulting *Sma*I macrorestriction patterns were analysed and followed by selective hybridization with phage specific probes. Typeability of prophage typing by means of *Sma*I hybridization was 100% as for previous hybridizations, while discriminatory power was slightly lower, reaching 69 %. PFGE typing turned out to be a method with the highest discriminatory power, reaching up to 81 %, though this value is comparable to that of *Hind*III hybridization.

The above listed values of typeability and discriminatory power were compared with results of seven other typing methods performed on the same set of strains previously, including antibiotic susceptibility testing, phage typing, PCR-based prophage typing, RAPD, ribotyping, SCCmec-typing and restriction analysis of plasmids.

All methods, apart from phage typing and plasmid typing, showed 100% typeability. When all discriminatory powers were compared, the methods performed in this work reached the highest values in the given order: PFGE-typing, *Hind*III prophage typing, *Cla*I prophage typing and *Sma*I prophage typing. The lowest discriminatory power was that of ribotyping.

On the basis of achieved results, it is possible to make a conclusion, that the hybridization-based method of prophage typing seems to be a suitable method for distinguishing between closely related strains of *S. aureus*. Typeability of this method is 100 % and its discriminatory power is comparable to that of PFGE.

## 8. LITERATURA

Ackermann HW. 1998. Tailed bacteriophages: The order Caudovirales. *Adv Virus Res.* **51**: 135-201.

Ackermann HW. 2001. Frequency of morphological phage descriptions in the year 2000. Brief review. *Arch Virol.* **146**: 843-857.

Ackermann HW, DuBow MS. 1987. *Viruses of Procaryotes. Vol. 2: Natural Groups of Bacteriophages.* CRS Press, Boca Raton.

Ackermann HW, DuBow MS, Jarvis AW, Jones LA, Krylov VN, Maniloff J, Rocourt J, Safferman RS, Schneider J, Seldin L. 1992. The species concept and its application to tailed phages. *Arch Virol.* **124**: 69-82.

Argos P, Landy A, Abremski K, Egan JB, Haggard-Ljungquist E, Hoess RH, Kahn ML, Kalionis B, Narayana SV, Pierson LS. 1986. The integrase family of site-specific recombinases: regional similarities and global diversity. *EMBO J.* **5**: 433-440.

Asheshov EH. 1967. Bacteriophage typing of staphylococci. p. 173-184. *In Progress in microbial techniques.* Butterworth, London

Baba T, Takeuchi F, Kuroda M, Yuzawa H, Aoki K, Oguchi A, Nagai Y, Iwama N, Asano K, Naimi T, Kuroda H, Cui L, Yamamoto K, Hiramatsu K. 2002. Genome and virulence determinants of high virulence community-acquired MRSA. *Lancet.* **359**: 1819-1827.

Beard-Pegler MA, Vickery AM. 1985. Lysogenicity of methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus*. *J Med Microbiol.* **20**: 147-155.

Betley MJ, Mekalanos JJ. 1985. Staphylococcal enterotoxin A is encoded by phage. *Science.* **229**: 185-187.

Black LW. 1988. DNA packaging in dsDNA Bacteriophages. p. 321-371. *In R. Calendar (ed), The bacteriophages, Vol 1.* Plenum Press, New York.

Borecká P, Rosypal S, Pantůček R, Doškař J. 1996. Localization of prophages of serological group B and F on restriction fragments defined in the restriction map of *Staphylococcus aureus* NCTC 8325. FEMS Microbiol Lett. **143**: 203-210.

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

Brandis H., Lenz W. 1984. Staphylokokken Bakteriophagen, p.186-214. In W. Meier (ed.) Staphylokokken und Staphylokokken Erkrankungen. Fischer, Jena.

Brussow H, Canchaya C, Hardt WD. 2004. Phages and the evolution of bacterial pathogens: from genomic rearrangements to lysogenic conversion. Microbiol Mol Biol Rev. **68**: 560-602.

Brussow H, Desiere F. 2001. Comparative phage genomics and the evolution of *Siphoviridae*: insights from dairy phages. Mol Microbiol. **39**: 213-222.

Campbell A. 1988. Phage evolution and speciation, p.1-13. In R. Calendar (ed.), The bacteriophages, Vol 1. Plenum Press, New York.

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

Carroll D, Kehoe M, Cavanagh D, Coleman D. 1995. Novel organization of the site-specific integration and excision recombination functions of the *Staphylococcus aureus* serotype F virulence-converting phages  $\phi$ 13 and  $\phi$ 42. Mol Microbiol. **16**: 877-893.

Chesneau O, Morvan A, Aubert S, el Solh N. 2000. The value of rRNA gene restriction site polymorphism analysis for delineating taxa in the genus *Staphylococcus*. Int J Syst Evol Microbiol. **50**: 689-697.

Coleman DC, Sullivan DJ, Russell RJ, Arbuthnott JP, Carey BF, Pomeroy HM. 1989. *Staphylococcus aureus* bacteriophages mediating the simultaneous lysogenic conversion of

$\beta$ -lysin, staphylokinase and enterotoxin A: Molecular mechanism of triple conversion. *J Gen Microbiol.* **135**: 1979- 1697.

Comtois RD. 1960. Changes in the phage-typing patterns of Staphylococci following lysogenization with a related group of staphylococcus bacteriophages. *Can J Microbiol.* **6**: 491-502.

Desiere F, Lucchini S, Brussow H. 1999. Comparative sequence analysis of the DNA packaging, head and tail morphogenesis modules in the temperate cos-site *Streptococcus thermophilus* bacteriophage Sfi 21. *Virology.* **260**: 244-253.

Doškař J, Pallová P, Pantůček R, Rosypal S, Růžičková V, Pantůčková P, Kailerová J, Klepárník K, Malá Z, Boček P. 2000. Genomic relatedness of *Staphylococcus aureus* phages of the International Typing Set and detection of serogroup A, B, and F prophages in lysogenic strains. *Can J Microbiol.* **46**: 1066-1076.

Etienne J, Poitevin-Later F, Renaud F, Fleurette J. 1990. Plasmid profiles and genomic DNA restriction endonuclease patterns of 30 independent *Staphylococcus lugdunensis* strains. *FEMS Microbiol Lett.* **55**: 93-97.

Goerke C, Koller J, Wolz C. 2006. Ciprofloxacin and trimethoprim cause phage induction and virulence modulation in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* **50**: 171-177.

Gurtler V, Barrie HD, Mayall BC. 2001. Use of denaturing gradient gel electrophoresis to detect mutation in VS2 of the 16S-23S rDNA spacer amplified from *Staphylococcus aureus* isolates. *Electrophoresis.* **22**: 1920-1924.

Hájek V. 1983. Diagnostika stafylokoků a stafylokových infekcí. *Acta hygienica, epidemiologica et microbiologica.* Příloha 5: 33-39.

Hendrix RW. 1999. Evolution: the long evolutionary reach of viruses. *Curr Biol.* **9**: 914-917.

Hendrix RW. 2002. Bacteriophages: evolution of the majority. *Theor Popul Biol.* **61**: 471-480.



Hendrix RW, Hatfull GF, Smith MC. 2003. Bacteriophages with tails: chasing their origins and evolution. *Res Microbiol.* **154**: 253-257.

Hendrix RW, Smith MC, Burns RN, Ford ME, Hatfull GF. 1999. Evolutionary relationships among diverse bacteriophages and prophages: all the world's a phage. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **96**: 2192-2197.

Hunter PR. 1990. Reproducibility and indices of discriminatory power of microbial typing methods. *J Clin Microbiol.* **28**: 1903-1905.

Hunter PR, Gaston MA. 1988. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J Clin Microbiol.* **26**: 2465-2466.

Iandolo JJ, Worrell V, Groicher KH, Qian Y, Tian R, Kenton S, Dorman A, Ji H, Lin S, Loh P, Qi S, Zhu H, Roe BA. 2002. Comparative analysis of the genomes of the temperate bacteriophages  $\phi$ 11,  $\phi$ 12 and  $\phi$ 13 of *Staphylococcus aureus* 8325. *Gene.* **289**: 109-118.

Juhala RJ, Ford ME, Duda RL, Youlton A, Hatfull GF, Hendrix RW. 2000. Genomic sequences of bacteriophages HK97 and HK022: pervasive genetic mosaicism in the lambdoid bacteriophages. *J Mol Biol.* **299**: 27-51.

Kaneko J, Kimura T, Narita S, Tomita T, Kamio Y. 1998. Complete nucleotide sequence and molecular characterization of the temperate staphylococcal bacteriophage PVL carrying Pantan-Valentine leukocidin genes. *Gene.* **215**: 57-67.

Kreiswirth BN, Lutwick SM, Chapnick EK, Gradon JD, Lutwick LI, Sepkowitz DV, Eisner W, Levi MH. 1995. Tracing the spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by Southern blot hybridization using gene-specific probes of mec and Tn554. *Microb Drug Resist.* **1**: 307-313.

Kuntová L. 2006. Molekulární analýza plazmidů meticilin rezistentních kmenů *Staphylococcus aureus*. Diplomová práce Oddělení GMB PŘF MU.

Kwan T, Liu J, DuBow M, Gros P, Pelletier J. 2005. The complete genomes and proteomes of 27 *Staphylococcus aureus* bacteriophages. Proc Natl Acad Sci U S A. **102**: 5174-5179.

Labrie S, Moineau S. 2000. Multiplex PCR for detection and identification of lactococcal bacteriophages. Appl Environ Microbiol. **66**: 987-994.

Lacey RW. 1980. Evidence for two mechanisms of plasmid transfer in mixed cultures of *Staphylococcus aureus*. J Gen Microbiol. **119**: 423-435.

Lawrence JG. 1999. Gene transfer, speciation, and the evolution of bacterial genomes. Curr Opin Microbiol. **2**: 519-523.

Lawrence JG, Hatfull GF, Hendrix RW. 2002. Imbroglios of viral taxonomy: genetic exchange and failings of phenetic approaches. J Bacteriol. **184**: 4891-905.

Lee CY, Iandolo JJ. 1986. Lysogenic conversion of staphylococcal lipase is caused by insertion of the bacteriophage L54a genome into the lipase structural gene. J Bacteriol. **166**: 385-391.

Le Marrec C, van Sinderen D, Walsh L, Stanley E, Vlegels E, Moineau S, Heinze P, Fitzgerald G, Fayard B. 1997. Two groups of bacteriophages infecting *Streptococcus thermophilus* can be distinguished on the basis of mode of packaging and genetic determinants for major structural proteins. Appl Environ Microbiol. **63**: 3246-3253.

Lindsay JR, Ruzin, A, Ross HF, Kurepina N, Novick RP. 1998. The gene for toxic shock toxin is carried by a family of mobile pathogenicity islands in *Staphylococcus aureus*. Mol. Microbiol. **29**: 527-543.

Loessner MJ, Gaeng S, 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.

- Loessner MJ, Maier SK, Daubek-Puza H, Wendlinger G, Scherer S. 1997. Three *Bacillus cereus* bacteriophage endolysins are unrelated but reveal high homology to cell wall hydrolases from different bacilli. *J Bacteriol.* **179**: 2845-2851.
- Lucchini S, Desiere F, Brussow H. 1999. Similarly organized lysogeny modules in temperate *Siphoviridae* from low GC content gram-positive bacteria. *Virology.* **263**: 427-435.
- Maniloff J, Ackermann HW. 1998. Taxonomy of bacterial viruses: establishment of tailed virus genera and the order Caudovirales. *Arch Virol.* **143**: 2051-2063.
- Maslow J, Mulligan ME. 1996. Epidemiologic typing system. *Infect Control Hosp Epidemiol.* **17**: 595-604.
- Marples RP, van Leeuwen WJ. 1987. International Committee on Systematic Bacteriology. Subcommittee on Phage Typing of Staphylococci. Minutes on the meeting. *Int J Syst Bacteriol.* **37**: 174-175.
- Matthews AM, Novick RP. 2005. Staphylococcal phages. p. 297-318. *In* Waldor MK, Friedman DI, Adhya SL (ed.). *Phages: their role in bacterial pathogenesis and biotechnology.* ASM press, Washington, DC.
- Melter O, Santos Sanches I, Schindler J, Aires de Sousa M, Mato R, Kovářová V, Žemličková H, de Lencastre H. 1999. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clonal types in the Czech Republic. *J Clin Microbiol.* **37**: 2798-2803.
- Narita S, Kaneko J, Chiba J, Piemont Y, Jarraud S, Etienne J, Kamio Y. 2001. Phage conversion of Pantone-Valentine leukocidin in *Staphylococcus aureus*: molecular analysis of PVL-containing phage,  $\phi$ SLT. *Gene.* **268**: 195-206.
- Novick RP, Edelman I, Lofdahl S. 1986. Small *Staphylococcus aureus* plasmids are transduced as linear multimers that are formed and resolved by replicative processes. *J Mol Biol.* **192**: 209-220.

Novick RP, Schlievert P, Ruzin A. 2001. Pathogenicity and resistance islands of staphylococci. *Microbes Infect.* **3**: 585-594.

O'Sullivan D, Twomey DP, Coffey A, Hill C, Fitzgerald GF, Ross RP. 2000. Novel type I restriction specificities through domain shuffling of HsdS subunits in *Lactococcus lactis*. *Mol Microbiol.* **36**: 866-875.

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

Pantůček R, Gotz F, Doškař J, Rosypal S. 1996. Genomic variability of *Staphylococcus aureus* and the other coagulase-positive *Staphylococcus* species estimated by macrorestriction analysis using pulsed-field gel electrophoresis. *Int J Syst Bacteriol.* **46**: 216-222.

Pilousová L. 2003. Příprava univerzální sondy pro detekci profágů v kmenech *Staphylococcus aureus*. Diplomová práce KGMB PřF MU Brno.

Rohwer F, Edwards R. 2002. The Phage Proteomic Tree: a genome-based taxonomy for phage. *J Bacteriol.* **184**: 4529-4535.

Ruzin A, Lindsay J, Novick RP. 2001. Molecular genetics of SaPII- a mobile pathogenicity island in *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol.* **41**: 365-377.

Růžicková V, Pantůček R, Kolářová M, Dobrákovová E, Hotař M, Hansianová M, Ševčíková A, Urbášková P, Petráš P, Doškař J. 2006. Genotypic characterization and molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated in a Czech hospital burn center, 1999-2003. (nepublik.)

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, N. Y. 2nd ed.

Sedláček I, Švec P. 1999. Fenotypová a genotypová analýza kmenů MRSA. In: Doškař J.: Závěrečná zpráva o řešení grantového projektu GA ČR. Registrační číslo 301/97/1192.

Molekulární identifikace a diagnostika stafylokoků způsobujících nozokomiální infekce. Masarykova univerzita, Brno.

Sekiguchi J, Fujino T, Saruta K, Konosaki H, Nishimura H, Kawana A, Kudo K, Kondo T, Yazaki Y, Kuratsuji T, Yoshikura H, Kirikae T. 2004. Prevalence of erythromycin-, tetracycline-, and aminoglycoside- resistance genes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in hospitals in Tokyo and Kumamoto. *Jpn J Infect Dis.* **57**: 74-77.

Smeltzer MS, Hart ME, Iandolo JJ. 1994. The effect of lysogeny on the genomic organization of *Staphylococcus aureus*. *Gene.* **138**: 51-57.

Struelens MJ. 1996. Consensus guidelines for appropriate use and evaluation of microbial epidemiologic typing systems. *Clin Microbiol Infect.* **2**: 2-11.

Sumbly P, Waldor MK. 2003. Transcription of the toxin genes present within the Staphylococcal phage phiSa3ms is intimately linked with the phage's life cycle. *J Bacteriol.* **185**: 6841-6851.

Štěpán J, Pantůček R, Doškař J. 2004. Molecular diagnostics of clinically important staphylococci. *Folia Microbiol (Praha).* **49**: 353-386.

Tenover FC, Arbeit R, Archer G, Biddle J, Byrne S, Goering R, Hancock G, Hebert GA, Hill B, Hollis R, et al. 1994. Comparison of traditional and molecular methods of typing isolates of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol.* **32**: 407-415.

Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV. 1997. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. *Infect Control Hosp Epidemiol.* **18**: 426-439.

Trilla A, Nettleman MD, Hollis RJ, Fredrickson M, Wenzel RP, Pfaller MA. 1993. Restriction endonuclease analysis of plasmid DNA from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: clinical application over a three-year period. *Infect Control Hosp Epidemiol.* **14**: 29-35.

van Belkum A, Kluytmans J, van Leeuwen W, Bax R, Quint W, Peters E, Fluit A, Vandenbroucke-Grauls C, van den Brule A, Koeleman H, et al. 1995. Multicenter evaluation of arbitrarily primed PCR for typing of *Staphylococcus aureus* strains. J Clin Microbiol. **33**: 1537-1547.

van Leeuwen W, Libregts C, Schalk M, Veuskens J, Verbrugh H, van Belkum A. 2001. Binary typing of *Staphylococcus aureus* strains through reversed hybridization using digoxigenin-universal linkage system-labeled bacterial genomic DNA. J Clin Microbiol. **39**: 328-331.

van Leeuwen W, Verbrugh H, van der Velden J, van Leeuwen N, Heck M, van Belkum A. 1999. Validation of binary typing for *Staphylococcus aureus* strains. J Clin Microbiol. **37**: 664-674.

van Wamel WJ, Rooijackers SH, Ruyken M, van Kessel KP, van Strijp JA. 2006. The innate immune modulators staphylococcal complement inhibitor and chemotaxis inhibitory protein of *Staphylococcus aureus* are located on beta-hemolysin-converting bacteriophages. J Bacteriol. **188**: 1310-1315.

Vidhani S, Mehndiratta PL, Mathur MD. 2001. Study of methicillin resistant *S. aureus* (MRSA) isolates from high risk patients. Indian J Med Microbiol. **19**: 13-16.

Voborníková M. 2004. Molekulární epidemiologie metilicilin rezistentních kmenů *Staphylococcus aureus* izolovaných z FN Brno-Bohunice. Diplomová práce KGMB PŘF MU Brno.

Weller TM. 2000. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* typing methods: which should be the international standard? J Hosp Infect. **44**: 160-172.

Welsh J, McClelland M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nucleic Acids Res. **18**: 7213-7218.

Wilkinson DM, Andrews S, Stewart PR. 1987. Bacteriophages associated with multiresistant *Staphylococcus aureus* in Australia. J Med Microbiol. **23**: 119-126.

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

Yarwood JM, McCormick JK, Paustian ML, Orwin PM, Kapur V, Schlievert PM. 2002. Characterization and expression analysis of *Staphylococcus aureus* pathogenicity island 3. Implications for the evolution of staphylococcal pathogenicity islands. *J Biol Chem.* **277**: 13138-13147.

Ye ZH, Lee C. 1989. Nucleotide sequence and genetic characterization of staphylococcal bacteriophage L54a *int* and *xis* genes. *J Bacteriol.* **171**: 4146-4153.

Ye ZH, Lee C. 1993. Cloning, sequencing, and genetic characterization of regulatory genes, *rinA* and *rinB*, required for the activation of staphylococcal phage  $\phi$ 11 *int* expression. *J Bacteriol.* **175**: 1095-1102.

Young I, Wang I, Roof WD. 2000. Phages will out: strategies of host cell lysis. *Trends Microbiol.* **8**: 120-128.

Young R, Bläsi U. 1995. Holins: form and function in bacteriophage lysis. *FEMS Microbiol Rev.* **17**: 191-205.

Zou D, Kaneko J, Narita S, Kamio Y. 2000. Prophage, phiPV83-pro, carrying panton-valentine leukocidin genes, on the *Staphylococcus aureus* P83 chromosome: comparative analysis of the genome structures of phiPV83-pro, phiPVL, phi11, and other phages. *Biosci Biotechnol Biochem.* **64**: 2631-2643.