

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Faktory virulence *Staphylococcus aureus*

Veronika Hoskovcová

Bakalářská práce

2012

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE
(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Veronika Hoskovcová**
Osobní číslo: **C08507**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Klinická biologie a chemie**
Název tématu: **Faktory virulence Staphylococcus aureus**
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

Zpracujte literární rešerši obsahující:

1. Charakteristika Staphylococcus aureus
2. Faktory virulence
3. Onemocnění, které způsobuje včetně patogeneze
3. Laboratorní diagnostika
4. Možnosti terapie

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Podle pokynů vedoucího bakalářské práce.

Vedoucí bakalářské práce:

Mgr. Rudolf Kukla

Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce:

3. října 2011

Termín odevzdání bakalářské práce:

22. června 2012



prof. Ing. Petr Lošťák, DrSc.

děkan

L.S.



doc. RNDr. Zuzana Bílková, Ph.D.

vedoucí katedry

V Pardubicích dne 23. února 2011

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že na moji práci se vztahují práva a povinnosti plynoucí ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 19. 6. 2012

Veronika Hoskovcová

Děkuji tímto vedoucí práce RNDr. Petře Mosio, Ph.D. a Mgr. Rudolfu Kuklovi za cenné rady a připomínky při vypracování bakalářské práce.

ANOTACE

Staphylococcus aureus patří mezi grampozitivní koaguláza-pozitivní koky je i přes vývoj nových antibiotik významným lidským patogenem. Je častým původcem běžných kožních infekcí, často se také vyskytuje ve formě bezpříznakového nosičství. Při selhání imunitního systému může tento podmíněný patogen vyvolat závažná onemocnění, která mohou vyvrcholit průnikem bakterií do krevního oběhu a sepsí.

Patogenita této bakterie je dána tvorbou faktorů virulence, které umožňují invadovat tkáně a napomáhají šíření infekce. Produkuje také celou řadu toxinů, které se podílejí na patologických procesech v hostitelském organismu. Nedílnou součástí virulence *Staphylococcus aureus* je schopnost různými mechanismy odolávat antimikrobiální terapii a také schopnost tvořit biofilm.

Klíčová slova: *Staphylococcus aureus*, faktory virulence, tvorba biofilmu, rezistence na antibiotika

TITLE

Staphylococcus aureus, virulence factors.

ANNOTATION

Staphylococcus aureus belongs to gram-positive and coagulase-positive cocci and is, even over development of new antibiotics, a significant human pathogen. This bacterium is common causative agent of cutaneous infections and often occurs in a form of asymptomatic carriage. When the immunity system fails, this opportunistic pathogen may cause serious live threatening diseases, which could result in penetration of bacteria to the bloodstream and in development of sepsis.

A pathogenicity of *Staphylococcus aureus* is enabled by a production of virulence factors, which facilitate the invasion into the tissues and help to disseminate the infection. This bacterium produces many toxins, which participate in pathological processes in the host organism. An ability to resist an antimicrobial therapy by many different mechanisms and biofilm formation are also very important components of *Staphylococcus aureus* virulence.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, virulence factors, biofilm formation, antimicrobial resistance

SEZNAM ZKRATEK

ATB	antibiotikum
ClfA	shlukovací faktor A (z angl. clumping factor A)
ET	exfoliativní toxin
FnBP	fibronektin-vázající protein (z angl. fibronectin binding protein)
MRSA	methicilin rezistentní <i>S. aureus</i>
MSCRAMMs	z angl. microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules
MSSA	methicilin citlivý <i>S. aureus</i> (z angl. methicillin-susceptible <i>S. aureus</i>)
NET	neutrofilové extracelulární pasti (z angl. neutrophil extracellular traps)
PBP	z angl. penicillin-binding proteins
PVL	Panton-Valentinův leukocidin
PCR	polymerázová řetězová reakce (z angl. polymerase chain reaction)
<i>S.</i>	<i>Staphylococcus</i>
SCVs	trpasličí varianty <i>S. aureus</i> (z angl. small-colony variants)
SE	stafylokokový enterotoxin
SFP	stafylokoková alimentární intoxikace (z angl. staphylococcal food poisoning)
SSSS	syndrom opařené kůže (z angl. staphylococcal scalded skin syndrome)
TSS	syndrom toxického šoku
TSST	toxin syndromu toxického šoku
VISA	vankomycin intermediárně citlivý <i>S. aureus</i> (z angl. vankomycin-intermediate susceptible <i>S. aureus</i>)
VRSA	vankomycin rezistentní <i>S. aureus</i>

OBSAH

1 ÚVOD	8
2 ETIOLOGIE	8
2.1 Historie a taxonomie	8
2.2 Morfologie bakteriálních buněk	9
2.3 Faktory virulence	9
2.3.1 Faktory virulence vázané na buněčnou stěnu	10
2.3.2 Extracelulární faktory virulence	12
2.3.3 Mechanismy antibiotické rezistence	21
2.4 Výskyt	23
2.5 Patogeneze	23
2.6 Patogenita	24
3 LABORATORNÍ DIAGNOSTIKA	26
3.1 Vyšetřovaný materiál	26
3.2 Mikroskopické vyšetření	27
3.3 Kultivace	27
3.4 Screeningové a biochemické testy	28
3.5 Molekulárně biologické metody	29
3.6 Fagotypizace	29
3.7 Metody nepřímého průkazu	29
4 TERAPIE	30
4.1 Antibiotika	30
5 ZÁVĚR	31
SEZNAM LITERATURY	33

1 ÚVOD

Staphylococcus aureus byl objeven před více než 130-ti lety a patří mezi významné podmíněné patogeny člověka. V lidské populaci se nachází přibližně 20 – 50 % nosičů *Staphylococcus aureus*. Nejčastěji vyvolává kožní infekce nezávažného charakteru. V případě oslabení imunitního systému hostitele může způsobit endogenní infekce a po průniku do krevního oběhu i sepse. Léčba bývá často svízelná vzhledem k výskytu rezistentních nebo multirezistentních kmenů této bakterie.

Staphylococcus aureus disponuje mnoha faktory virulence, jež mu napomáhají k šíření infekce a perzistenci v hostitelském organismu. Mezi často diskutované faktory virulence patří toxiny, z nichž některé mají povahu superantigenů. Velký význam v patogenezi mají faktory virulence, jež umožňují adhezi na povrch hostitelských buněk. Řada kmenů může také vytvářet biofilmy, ve kterých jsou bakteriální buňky ve zvýšené míře chráněny před imunitním systémem i antibiotickou terapií. Dalšími často zmiňovanými tématy jsou – intracelulární přežívání *Staphylococcus aureus*, výskyt fenotypově odlišných variant, tvorba pigmentu a hlavně rezistence na antibiotika.

Předložená práce je zaměřena na charakteristiku faktorů virulence *Staphylococcus aureus*, součástí práce je i obecný přehled, patogeneze a terapie infekcí vyvolaných touto bakterií.

2 ETIOLOGIE

2.1 Historie a taxonomie

Prvními vědci, kteří v mikroskopickém preparátu pozorovali shluky, trsy a řetízky koků mezi leukocyty v preparátu hnisu, byli v roce 1882 francouzský biolog Louis Pasteur a skotský lékař Alexander Ogston. Ogston odvodil název bakterie z řeckého *staphylé* (hrozen vína) a latinského *coccus* (podle kulatého tvaru). O dva roky později byla tato bakterie oficiálně pojmenována německým bakteriologem A. J. F. Rosenbachem jako *Staphylococcus aureus* (dále *S. aureus*).

Rod *Staphylococcus* patřil dlouhou dobu spolu s rodem *Micrococcus* do čeledi *Micrococcaceae*. V současné době je na základě genetických analýz řazen do říše *Eubacteria*, kmene *Firmicutes*, třídy *Bacilli*, řádu *Bacillales* a čeledi *Staphylococcaceae* (Becker et al., 2004; Crossley et al., 2009; Vos et al., 2009).

V současnosti tento rod zahrnuje 46 druhů a 24 poddruhů (Euzéby, 2012). Čeští mikrobiologové se podíleli na popsání šesti druhů stafylokoků. Prof. Václav Hájek z Univerzity Palackého v Olomouci objevil *S. intermedius*, *S. chromogenes*, *S. muscae* a *S. saprophyticus* subsp. *bovis*. Doc. Roman Pantůček v roce 2005 popsal *S. simiae* a v roce 2010 Dr. Dana Nováková *S. microti* (Petráš, 2010).

Stafylokoky se tradičně dělí podle schopnosti koagulovat plasmu na dvě skupiny - koaguláza-pozitivní (7 druhů) a koaguláza-negativní stafylokoky. Mezi nejvýznamnější koaguláza-pozitivní stafylokoky patří *S. aureus* subsp. *aureus*, *S. intermedius* a *S. hyicus*. *S. aureus* subsp. *anaerobius* není pro humánní medicínu významný, nebude proto v této práci dále uváděn.

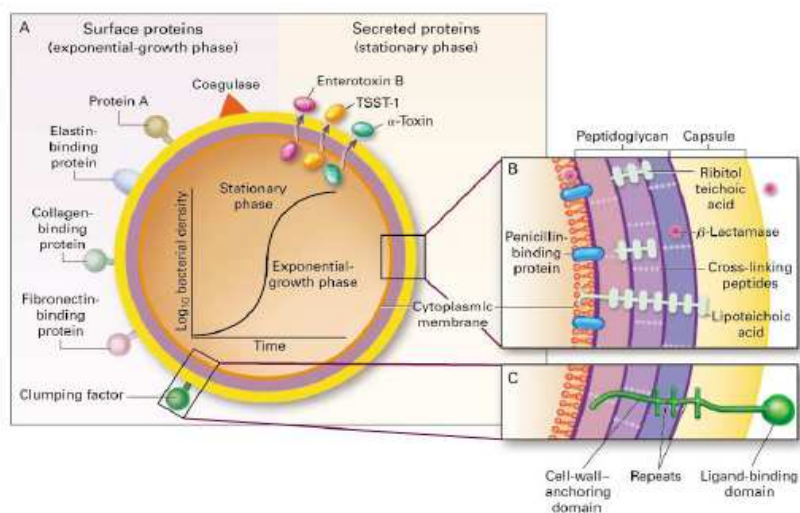
2.2 Morfologie bakteriálních buněk

S. aureus je grampozitivní, kataláza-pozitivní, nepohyblivý a nesporulující fakultativní anaerob. Protože se dělí ve více na sebe kolmých rovinách, vytváří typické, nepravidelné shluky připomínající hrozen. Mohou tvořit polysacharidová pouzdra. Většina kmenů produkuje žlutý až žlutooranžový pigment (Katzif et al., 2005).

S. aureus je poměrně odolný vůči podmínkám zevního prostředí. Snáší přítomnost 10% NaCl a telluričitanu draselného v kultivačním médiu. Je rovněž rezistentní k bacitracinu a lysozymu (Votava et al., 2003).

2.3 Faktory virulence

Faktory virulence *S. aureus* lze rozdělit na ty, jež jsou vázány na buněčnou stěnu a na extracelulární látky, uvolňované do prostředí (viz obrázek 1).



Obrázek 1: Faktory virulence *S. aureus* (Lowy, 1998)

Horizontální přenos genů pomocí plazmidů a chromozomální mutace výrazně ovlivňují virulenci této bakterie, včetně její rezistence k antibiotikům. Změny v genomu umožňují *S. aureus* setrvat v organismu hostitele a jsou často překážkou při terapii infekcí vyvolaných tímto patogenem (Kumar et al., 2011).

2.3.1 Faktory virulence vázané na buněčnou stěnu

Peptidoglykan

Tvoří až 90 % buněčné stěny grampozitivních bakterií a zpevňuje buněčnou stěnu 25 souvislými vrstvami. Peptidoglykan je polysacharid tvořený N-acetylglukosaminem a kyselinou N-acetylmuramovou, které jsou spojeny beta-1,4-glykosidickými vazbami. Na karboxylové skupině kyseliny N-acetylmuramové jsou navázány tetrapeptidy, složené z L-alaninu, D-alaninu, D-glutaminu a L-lysinu, které tak představují opakující se jednotku ve struktuře peptidoglykanu. Tetrapeptidy se k sobě navzájem vážou peptidickými můstky.

Enzymy, jež se podílí na syntéze peptidoglykanu, se nazývají PBP (z angl. penicillin-binding proteins). Na PBP se váží beta-laktamová antibiotika, která inhibují tvorbu peptidoglykanu. Rezistence k většině beta-laktamovým antibiotikům je určena genem *mec A*, který určuje syntézu PBP2a. PBP2a má na rozdíl od PBP až o tři řády nižší afinitu k beta-laktamovým antibiotikům (Schindler, 2010).

Peptidoglykan podněcuje uvolňování cytokinů z makrofágů, aktivaci komplementu a shlukování krevních destiček. Přímo stimuluje B lymfocyty k tvorbě imunoglobulinů (Dworkin et al., 2006).

Kyselina teichoová

Peptidoglykan prostupuje kyselina teichoová, která je lineárním polymerem ribitolfosfátu nebo glycerolfosfátu s glykosidicky navázanými cukry. V peptidoglykanu jsou teichoové kyseliny kovalentně spojeny s kyselinou N-acetylmuramovou.

Svým nábojem přispívá kyselina teichoová k negativnímu náboji bakteriální buňky. Zprostředkovává adhezi na buňky nosní sliznice (Aly et al., 1980) a uplatňuje se také v první fázi adheze na umělé povrchy (implantáty), čímž napomáhá tvorbě biofilmu (Gross et al., 2001).

Pouzdro

Pouzdro má polysacharidový charakter. Opouzdrěné kmeny *S. aureus* jsou virulentnější, vytváří mukoidní kolonie a lépe odolávají fagocytóze.

Schopnost *S. aureus* vytvářet pouzdro byla poprvé popsána Gilbertem v roce 1931. Autor se však díky nedokonalým metodám průkazu pouzdra domníval, že je opouzdřeno jen minimum kmenů *S. aureus*. Teprve v roce 1982 Karakawa a Vann navrhli nový způsob průkazu kapsulárního polysacharidu. Jejich studie prokázala produkci pouzdra u většiny kmenů *S. aureus*.

Opouzdřené kmeny se dělí do osmi sérotypů. Sérotypy 1 a 2 tvoří na pevných půdách mukoidní kolonie, v klinickém materiálu je nalézáme zřídka. Kmeny sérotypů 3–8 na pevných půdách tvoří hladké kolonie a jsou takřka nerozeznatelné od kmenů, které pouzdro neprodukuje. Kmeny sérotypů 5 (25 %) a 8 (50 %) patří k nejčastěji izolovaným kmenům *S. aureus* z člověka (O'Riordan a Lee, 2004).

Povrchové adhezní molekuly

Povrchové adhezní molekuly, jež patří do rodiny MSCRAMMs (z angl. microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules), zprostředkovávají adhezi bakterie k hostitelským buňkám, následnou kolonizaci a rozvoj infekčního procesu.

Do této rodiny patří clumping faktor, fibronectin-vázající protein (FnBP, z angl. fibronectin-binding protein), kolagen-vázající protein, protein A a další. FnBP zprostředkovává adhezi k fibronektinu na povrchu epiteliálních buněk. Bylo zjištěno, že kmeny *S. aureus* FnBP-deficitní adherují na epiteliální buňky dýchacího traktu pětikrát méně (Mongodin et al., 2002).

- **Clumping faktor A**

Clumping faktor A (ClfA, z angl. clumping factor A) neboli vázaná koaguláza napomáhá *S. aureus* ke shlukování tím, že koaguluje plazmu vazbou na aktivovaný prothrombin, který spouští polymeraci monomerů fibrinu na polymerní fibrin (Ghuysen a Hakenbeck, 1994). Fibrin uložený na povrchu může *S. aureus* účinně skrývat před imunitním systémem hostitele. ClfA je faktorem virulence účastnícím se rozvoje septické artrózy a infekce endokardu. Zvyšuje také virulenci kmenů *S. aureus* vyvolávajících sepsy (Josefsson et al., 2007).

- **Protein A**

Protein A je druhově specifickým skupinovým antigenem většiny kmenů *S. aureus*. Na peptidoglykan bakteriální stěny se váže kovalentně. Skládá se z pěti opakujících se jednotek, z nichž každá má schopnost vázat Fc část protilátky (hlavně IgG,

ale i IgM a IgA), čímž chrání stafylokoka před opsonizační aktivitou séra. Váže von Willebrandův faktor a napomáhá tak ke vzniku krevních sraženin (Graille et al., 2000).

Sortáza A

Jedná se o enzym (transpeptidázu), který kotví v buněčné stěně clumping faktor. Jeho N-konec je lokalizován v cytoplasmě a C-konec v buněčné stěně. Přípravuje štěpy (signály) pro protein A, fibronectin vázající protein a ClfA v LPXTG motivu (Honeyman et al., 2001). Hraje roli při zánětlivé artritidě a jiných zánětech (Josefsson et al., 2007).

2.3.2 Extracelulární faktory virulence

Volná koaguláza

Reakcí volné koagulázy s plazmatickým proteinem vzniká stafylothrombin, který katalyzuje změnu fibrinogenu na fibrin a tím napomáhá ke srážení plazmy (Ochei et al., 2000). Volná koaguláza také přispívá k tvorbě abscesů a k perzistenci *S. aureus* v hostitelských tkáních. Její role v patogenezi letálních sepsí je také významná (McAdow et al., 2012).

Kataláza

Štěpí toxický peroxid vodíku na vodu a kyslík. Vnitrobuněčná likvidace bakterie je závislá na kyslíku a proto obrana proti oxidativnímu stresu hraje důležitou roli v přežití bakterie. V tomto ohledu se na obraně bakterie proti oxidativní toxicitě uvnitř fagosomů podílí nejen kataláza, ale i superoxiddismutáza, peroxidáza a glutathionperoxidáza.

Kataláza se skládá ze čtyř podjednotek. Je stabilní při pH 4-9 a lze ji inaktivovat při teplotách nad 60 °C (Martin a Barrier, 1990). Množství uvolněné katalázy je závislé na množství produkovaného H₂O₂.

Hyaluronidáza

Hyaluronidáza (spreading factor) hydrolyzuje kyselinu hyaluronovou přítomnou v mezibuněčném tmelu a v mukoidech pojivové tkáně, což značně usnadňuje šíření stafylokoků a jejich toxinů do okolí. Stafylokoková hyaluronidáza má nízkou imunogenicitu. Specifické protilátky se nalézají jen u malého počtu nemocných s hlubokými infekcemi.

Hyaluronidáza má za úkol nejenom usnadňovat prostupování bakterií organismem, hydrolýza hyaluronové kyseliny zajišťuje také bakterii přívod energie a uhlíku. Z klinicky významných stafylokoků produkuje hyaluronidázu jenom *S. aureus*, dekapsulační test je tedy významným diagnostickým testem (obrázek 2) (Hart et al., 2009).



Obrázek 2: Dekapsulační test. Uprostřed je naočkovaný *S. aureus*, který produkuje hyaluronidázu. Hyaluronidáza rozpouští pouzdro *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*. Okolo naočkovaného *S. aureus* tedy rostou kmeny streptokoka neopouzdrěné. (Čížek, 2012)

Lipáza

Lipáza umožňuje stafylokokům pronikat přes mazové žlázy do podkožní tkáně hydrolýzou lipidů. Produkty lipolytické aktivity narušují funkci imunitního systému (Rollof a Normark, 1992).

Proteáza

Proteáza také hraje důležitou roli v degradaci tkáně, štěpí bílkoviny hydrolýzou peptidových vazeb mezi aminokyselinami. Stafylokoková proteáza specificky štěpí bílkovinné vazby na karboxylovém konci kyseliny asparagové a glutamové (Drapeau et al., 1972). Vykazuje maximální proteolytickou aktivitu v rozmezí pH 4-7,8. Inhibuje tvorbu biofilmu a ovlivňuje disperzi bakterií z biofilmu (Boles a Horswill, 2008).

Termostabilní nukleáza

Jedná se o termorezistentní protein, odolávající zahřátí na 100 °C více než 15 min. Napadá jádra lymfocytů, odštěpuje z deoxyribonukleové a ribonukleové kyseliny fosfomononukleosidy. Nukleáza produkovaná kmeny *S. aureus* humánního i zvířecího původu je sérologicky identická. Nalézá se u 90-96 % kmenů *S. aureus* (Atlas, 1985).

Neutrofilny jako primární efektorové buňky při imunitní odpovědi vytváří neutrofilové extracelulární pasti (NETs, z angl. neutrophil extracellular traps). NETs se skládají z jaderného DNA základu, spojeného s antimikrobiálními peptidy, histony a proteázami, které vytvářejí pasti pro polapení a likvidaci bakterií. Kmeny produkující nukleázu odolávají NETs zprostředkované antimikrobiální aktivitě lépe, než kmeny, které tento enzym neprodukují (Berends et al., 2010).

Fibrinolysin

Fibrinolysin je protein, který konvertuje plasminogen, inaktivní proenzym fibrinolytického systému, na plasmin, tedy jeho aktivní proteolytickou formu. Plasmin rozpouští fibrinové sraženiny a podporuje tak šíření stafylokokové infekce dále do tkání hostitele (Lijnen et al., 1991).

Produkce stafylokinázy je řízena buď lyzogenní konverzí, při které se kmeny tvořící beta-hemolysin a postrádající stafylokinázu mění na beta-hemolysin negativní a stafylokináza-pozitivní nebo je její syntéza kontrolována chromozomálními geny nezávislými na lyzogenních fázích (Dvořáková, 2008).

Stafylokináza může inhibovat IgG a komplementem zprostředkovanou imunitní odpověď na infekci *S. aureus*. Plasmin poutaný na povrch buněčné stěny bakterie štěpí opsoniny - IgG i fragment komplementu C3b (Fallon, 2009).

Von Willebrandův-vázající protein

Jedná se o sekretovaný protein, který napomáhá hemokoagulaci, podobně jako volná koaguláza. Nedávno objevený Von Willebrandův-vázající protein tak přispívá k tvorbě abscesů a perzistenci bakterie v hostitelské tkáni. Produkty koagulázové aktivity zachycují stafylokoky ve fibrinové síti a umožňují mu rozšiřovat se ve formě tromboembolických lézí po organismu a odolávat tak fagocytóze (McAdow et al., 2012).

Hemolyziny

Alfa-hemolyzin je polypeptid, který na krevním agaru z ovčích erytrocytů vyvolává tvorbu úplné hemolýzy (viz obrázek 3). Má nejen hemolytickou, ale také cytotoxickou, dermonekrotickou a letální aktivitu. Je sekretován ve formě rozpustného monomeru, jenž se napojuje hydrofobními vazbami na lipidy buněčných membrán, ve kterých agreguje na hexamerovou formu, vytvářející v membráně prstencovité útvary o průměru 10 nm naplněné vodou. Smrt buňky nastává v důsledku perforace buněčné membrány a poruchy osmoregulace. Lidské erytrocyty jsou relativně odolné, mají na svém povrchu lipidy s nízkou afinitou k alfa-hemolyzinu (Fischetti, 2000).

Po intradermální aplikaci vyvolává nekrózu kůže a po intravenózním podání má letální účinky pro teplotokrevné i studenokrevné živočichy. Na krevním agaru potlačuje účinky beta-hemolyzinu a naopak.

Gen *hla* kodující produkci alfa-hemolyzinu je umístěn na chromozomu. Kmeny *S. aureus* většinou produkují alfa-hemolyzin v kombinaci s delta-hemolyzinem. Protilátky proti alfa-hemolyzinu se tvoří poměrně dobře, nemají však protekční charakter (Acton, 2011).

Beta-hemolyzin (sfingomyelináza C) hydrolyzuje sfingomyelin v membránách červených krvinek, které i přes svou narušenou integritu nelyzují. Na krevním agaru s ovčími erytrocyty vyvolává tzv. hot-cold fenomén, jež probíhá ve dvou stádiích. První je neúplná hemolýza v důsledku štěpení sfingomyelinu, druhé je úplná hemolýza následkem snížení inkubační teploty z 37 °C na méně než 10 °C. Nejvíce sfingomyelinu je v ovčích a hovězích erytrocytech, proto jsou vůči beta-hemolyzinu nejcitlivější, lidské erytrocyty jsou citlivé méně. Beta-hemolyzin působí synergicky s delta-hemolyzinem a je antagonistou alfa-hemolyzinu (Fischetti, 2000).

Beta-hemolyzin má silnou monocytotoxickou aktivitu, lyzuje lidské monocyty už ve velmi malých koncentracích. Ovšem na granulocyty, fibroblasty, lymfocyty a erytrocyty v malých koncentracích cytotoxický účinek nemá (Walev et al., 1996).

Beta-hemolyzin má dobré imunogenní vlastnosti. Jeho produkce je charakteristická pro kmeny *S. aureus* zvířecí provenience (Hagan et al., 1988).



Obrázek 3: Kolonie *S. aureus* jsou obklopeny vnitřní zónou úplné hemolýzy vyvolané alfa-hemolyzinem a vnější zónou neúplné hemolýzy, způsobené beta-hemolyzinem (Kvaeg, 2011)

Gama-hemolyzin se skládá ze dvou složek a je biologicky aktivní pouze za účasti obou komponent (Ariyanti et al., 2011). Je výrazně méně toxický než alfa-hemolyzin. Účinky gama-hemolyzinu nelze sledovat na krevním agaru, jelikož je agarem inhibován. Vyvolává dobrou protilátkovou odpověď (Acton, 2011).

Delta-hemolyzin je peptid, který působí jako povrchově aktivní látka na buněčné membrány. Způsobuje hemolýzu lidských erytrocytů, je cytotoxický i na makrofágy, polymorfonukleáry a lymfocyty (Dhople a Nagaraj, 2005). Hemolýza na krevním agaru většinou nebývá patrná, protože je inhibován sérovými fosfolipidy. Je důležitým faktorem virulence při rozvoji zánětlivých onemocnění (Silva et al., 2004).

Panton-Valentinův leukocidin

Panton-Valentinův leukocidin (PVL) byl poprvé popsán roku 1894 doktorem Van de Veldem, který si všiml jeho schopnosti lyzovat leukocyty. Sir Philip Noel Panton a Francis Valentin jej roku 1932 dali do souvislosti s infekcí měkkých tkání způsobených *S. aureus* a byl po nich také pojmenován. Svou přítomností zvyšuje virulenci některých kmenů *S. aureus*, převážně komunitních MRSA, ale i methicilin citlivých kmenů *S. aureus* (MSSA, z angl. methicillin susceptible *S. aureus*) (Heinige et al., 2009).

S. aureus nasedá na poškozený epitel dýchacích cest po předchozí virové infekci a způsobuje sekundární infekce dýchacích cest. Pokud produkuje PVL může dojít k nekrotizující pneumonii a vzniku empyému. Typickými příznaky u onemocnění

způsobených kmeny produkujícími PVL jsou hemoptýza, hypotenze a těžký septický stav, který progreduje v multiorganové selhání a diseminovanou intravaskulární koagulopatii, často s fatálním průběhem (Petráš et al., 2009).

Toxin PVL je produkován jen zhruba 2 – 3 % kmenů *S. aureus*. Skládá se ze složky rychlé (F) a pomalé (S), označených podle jejich relativní rychlosti při chromatografickém dělení. Tyto složky exprimují geny *LukS* – PVL a *LukF* – PVL. Obě komponenty jsou polypeptidy, samotné neprokazují biologickou aktivitu, avšak při společném účinku se synergicky doplňují (Heinige et al., 2009).

PVL jako bakteriální cytotoxin tvoří tzv. beta-póry ve stěně imunitních buněk. Tvorbou pórů silně narušuje permeabilitu, iontovou výměnu a integritu cytoplazmatické membrány monocytů a makrofágů. *S. aureus* je tak chráněn před fagocytózou.

PVL se uplatňuje v patogenezi vážných kožních infekcí (Dinges et al., 2000) a svým účinkem se podobá hemolyzinům. Kmeny *S. aureus* produkující PLV se uplatňují při vzniku nekroticko-hemoragické lézí s následkem těžkých rekurentních infekcí kůže a měkkých tkání, nekrotizujících pneumonií a bakteriemií. Mortalita u komunitních pneumonií způsobených PVL pozitivním kmenem *S. aureus* se pohybuje okolo 40 % i při včas zahájené terapii (Heinige et al., 2009).

Enterotoxiny

Produkcí enterotoxinů lze prokázat asi u poloviny kmenů *S. aureus*. Tvar molekuly stafylokokového enterotoxinu (SE) připomíná elipsoid, jehož součástí jsou dvě nestejně velké domény. Větší z nich, doména A, obsahuje vysoce flexibilní disulfidickou vazbu, která se spolupodílí na emetické aktivitě enterotoxinů. Sekundární strukturu SE tvoří α -helixy a β -skládané listy. Primární struktura jednotlivých typů enterotoxinů vykazuje vysokou podobnost (Dinges et al., 2000).

Většina genů kódujících enterotoxiny je lokalizována na variabilních genetických elementech. Geny *sea* (kóduje SEA) a *see* (kóduje SEE) jsou součástí bakteriofágů, zatímco geny *sed* a *sej* jsou součástí plazmidu. Výjimku představují geny pro SEG, SEH a SEI, které se nachází na bakteriálním chromozomu.

Stafylokokové enterotoxiny SEA, SEB, SEC (varianty C1, C2 a C3), SED, SEE a SEG až SEU jsou superantigeny. Mají tedy schopnost aktivovat velké množství lymfocytů nezávisle na jejich antigenní specifitě (Alouf a Müller-Alouf, 2003; Letertre et al., 2003).

Všechny dosud identifikované SE se vyznačují několika společnými vlastnostmi, mezi něž patří vysoká termostabilita (snesou i půlhodinový var), odolnost vůči trávicím enzymům, schopnost vyvolat zvracení a průjem a podobná terciární struktura (Dinges et al., 2000).

SE způsobují časté alimentární intoxikace. Hlavním symptomem otravy z potravin je zvracení, jelikož enterotoxiny dráždí *nervus vagus* v žaludku. Zvracení může být doprovázeno nevolností, průjemem a bolestí v břišní oblasti. I když je úmrtnost vztažená na celou populaci nízká (0,03 %), pro určité skupiny, jako jsou děti a starší lidé, může dosahovat až 4,4 % (Alouf a Müller-Alouf, 2003).

Exfoliativní toxiny

Tyto stafylokokové exoproteiny způsobují většinu epidermolytických intoxikací, zejména u novorozenců a dospělých jedinců se sníženou imunitou. Řadí se mezi superantigeny. Doposud byly identifikovány a charakterizovány čtyři typy exfoliatinů, z nichž nejvíce se podílí na epidermolýzách exfoliativní toxin A (ETA) a exfoliativní toxin B (ETB) (Holochová et al., 2010).

ETA je tvořen 242 aminokyselinami a patří mezi termostabilní proteiny. Svou funkci si uchovává i po 30 minutovém zahřátí na 60 °C. Gen *eta* (kódující ETA) je lokalizován na chromozomu (Ladhani et al., 1999) v genomu rezidentního fága (Yamaguchi et al., 2000). ETB obsahuje 246 aminokyselin a nevykazuje odolnost vůči vyšším teplotám. Gen *etb* kódující ETB je umístěn na plazmidu (Iandolo et al., 1989).

ETA i ETB obsahují společný strukturní znak - α -helix. Předpokládá se, že interakce α -helixu se specifickým epidermálním receptorem vyvolává v molekule exfoliatinu konformační změny, při kterých dochází k odkrytí aktivního místa toxinu (Vath et al., 1997).

Oba typy exfoliativních toxinů mohou být příčinou vzniku stafylokokového syndromu "opažené kůže" (SSSS, z angl. staphylococcal scalded skin syndrome), při kterém dochází k odloučení horní vrstvy epidermis. Vznikají tak epidermální trhliny vyplněné tkáňovou tekutinou. Vytvářejí se puchýře a posléze dochází k odlupování povrchových vrstev pokožky. Toto onemocnění se objevuje v různých formách. V nejtěžších případech bývá zasaženo až 90 % povrchu těla (Ladhani et al., 1999).

Toxin syndromu toxického šoku (TSST)

TSST-1 je protein tvořený jedním polypeptidovým řetězcem o 194 aminokyselinách. Jedná se také o superantigen. Je dobře rozpustný ve vodě, odolný vůči teplu a proteolytickým činidlům. Na rozdíl od enterotoxinů nevyvolává zvracení, protože neobsahuje cysteinové zbytky, které by umožnily vznik disulfidické vazby (Dinges, et al., 2000; Alouf a Müller-Alouf, 2003).

Primární struktura TSST je ve srovnání s ostatními superantigeny značně odlišná (Dinges et al., 2000). Pro TSST-1 jako superantigen je rozhodující přítomnost aminokyselinových zbytků na zadní straně centrálního α -helixu (Blanco et al., 1990). Toxin syndromu toxického šoku je kódován genem *tst*, který se nachází na genomových ostrovech patogenity. Z dosud identifikovaných ostrovů jsou to SaPI-1, SaPI-2 a SaPI-bov (Alouf a Müller-Alouf, 2003).

TSST-1 je považován za hlavní příčinu syndromu toxického šoku (TSS, z angl. toxic shock syndrome). Toto onemocnění se projevuje vysokou horečkou, hypotenzí, vyrážkou, olupováním kůže během rekonvalescence, nervovými poruchami, multiorgánovým selháním a šokem, který je v 3-5 % případů smrtelný (Dinges et al., 2000).

TSS se projevuje ve dvou formách. První z nich je častější u žen, nesprávně používajících tampony při menstruaci a je výlučně spojena se schopností daného kmene *S. aureus* tvořit TSST-1. Ostatní superantigeny produkované stafylokoky nemají schopnost procházet přes vaginální sekret (Alouf a Müller-Alouf, 2003). Druhá forma TSS se vyskytuje bez ohledu na pohlaví. Z 50 % je způsobena superantigenem TSST-1. U ostatních případů jsou hlavní příčinou vzniku tohoto typu TSS stafylokokové enterotoxiny (Dinges et al., 2000).

Fenotypově odlišné formy *S. aureus*

Fenotypově odlišné formy *S. aureus*, tzv. trpasličí kolonie (SCVs, z angl. small-colony variants), jsou izolovány od pacientů trpících chronickými infekcemi dýchacích cest, osteomyelitidou, rannými infekce i cystickou fibrózou. Rostou v malých, nepigmentovaných, nehemolytických koloniích. Přežívají intracelulárně a jsou schopny návratu k původnímu stavu. Jejich role v patogenezi infekcí *S. aureus* není zcela objasněna.

SCVs mají vyšší rezistenci k antibiotikům, na která jsou fenotypově normální kmeny *S. aureus* citlivé. SCVs jsou více rezistentní k gentamicinu, fosfomycinu a ciprofloxacinu. Ke svému růstu SCVs vyžadují základní růstové faktory jako thymidin a menadion (Besier et al., 2006)

Intracelulární přežívání *S. aureus*

Ačkoliv je *S. aureus* označován za extracelulární patogen, nedávné studie odhalily jeho schopnost přežívat v makrofázích, endoteliálních buňkách, fibroblastech a dalších buňkách. Buněčně zprostředkovaná likvidace stafylokoků makrofágy slouží jako velmi důležitá obrana proti infekci. Přestože byla u *S. aureus* zjištěna schopnost úniku z fagosomu, mechanismus, jakým k tomu dochází, nebyl dosud objasněn. Možné intracelulární přežívání *S. aureus* by mohlo být příčinou zvýšené perzistence v hostitelském organismu (Das et al., 2009).

Biofilm

S. aureus je schopen vytvářet uskupení ve formě biofilmu, ve kterých je více či méně chráněn před imunitním systémem hostitele a do určité míry před účinkem antibiotik.

Tvorba biofilmu je cyklický proces iniciovaný chemickými a fyzikálními silami. Po adhezi na různé typy povrchů se bakterie množí, agregují a vytváří mikrokolonie obalené extracelulární polysacharidovou substancí. Ta je složena zejména z poly-N-acetylglukosaminu a kyseliny teichoové. V další fázi akumulace se vytváří typická struktura biofilmu, z které se na základě různých podnětů mohou bakteriální buňky uvolňovat do hostitelského makroorganismu (Chaignon et al., 2007).

S. aureus je schopen vytvářet biofilm na implantátech nebo zavedených katetrech a může postupným uvolňováním z biofilmu do krevního oběhu vyvolat infekční endokarditidu. Podle Chaignona et al. (2007) lze k účinné zábraně tvorby biofilmu na ortopedických implantátech v lidském organismu použít dispersin B s proteinázami (proteináza K nebo trypsin).

Běžné obranné mechanismy proti antibiotikům jako efluxní pumpy, modifikace nebo mutace cílového místa se nezdají být hlavním důvodem rezistence bakterií v biofilmu. Bakterie standardně citlivé k používaným ATB vykazují v biofilmu vůči těmto ATB rezistenci.

Důvodů zvýšené rezistence biofilmu k ATB je několik. Antibiotika hůře penetrují do vrstvy biofilmu, čímž není dosaženo potřebné koncentrace antibiotika. Dalším důvodem je skutečnost, že bakterie v biofilmu rostou pomaleji a proto antibiotika nemohou zasahovat do syntézy jejich buněčné stěny (Stewart a Costerton, 2001).

Pigmenty

Většina kmenů *S. aureus* produkuje pigment – žlutooranžový karotenoid stafyloxantin, který způsobuje typické zlatavé zbarvení kolonií. Kmeny *S. aureus* produkující pigmenty jsou hůře likvidovány neutrofilními granulocyty a makrofágy. Vzhledem k antioxidačním schopnostem stafyloxantinu, jeho produkce zvyšuje virulenci *S. aureus*. Kmeny, které (např. vlivem mutací) pigment neprodukují, jsou imunitním systémem snadno eliminovány. Jelikož pigmenty *S. aureus* patří k faktorům virulence, mohou být také novým cílem pro vývoj antibiotik (Liu et al., 2005).

2.3.3 Mechanismy antibiotické rezistence

Genom *S. aureus* je tvořen kruhovým chromozomem. Okolo 75 % genomu je shodných u všech kmenů *S. aureus*, zbylá část je tvořena bakteriofágy, ostrovy patogenity, plazmidy, transpozony, stafylokokovou chromozomovou kazetou, genomickými ostrovy a ostrůvky a inzertními sekvencemi (Dvořáková, 2008).

Prvním antibiotikem užívaným k terapii stafylokokových onemocnění byl penicilin, používaný od roku 1943. Většina kmenů *S. aureus* je v současnosti k penicilinu rezistentní díky produkci beta-laktamáz. Beta-laktamázy jsou enzymy rozkládající beta-laktamový kruh penicilinu. Rezistence k beta-laktamům je přenášena na plazmidech. Penicilinová antibiotika odolná k beta-laktamázám jsou methicilin, oxacilin, kloxacilin, dikloxacilin a flukloxacilin.

K methicilinu, který byl poprvé syntetizovaný v roce 1959, se ve Velké Británii vyvinula rezistence již po dvou letech klinického užívání. MRSA kmeny se nyní endemicky vyskytují v nemocničních zařízeních. Mechanismus rezistence *S. aureus* k methicilinu a ostatním beta-laktamovým antibiotikům je dán změnou cílového místa v buněčné stěně, kterým je PBP. Pokud je PBP modifikován na PBP2a, jenž má sníženou afinitu k beta-laktamovým antibiotikům, dochází k inhibici biosyntézy peptidoglykanu a k následnému rozpadu bakteriální buňky (Deurenberg et al., 2007).

Geny pro rezistenci k methicilinu se nazývají *mecA* a jsou přenášeny na stafylokokové chromozomové kazetě (Dvořáková, 2008). Kmeny MRSA jsou rezistentní k beta-laktamovým antibiotikům, karbapenemům a makrolidům. Velmi dobře jsou citlivé vůči glykopeptidům (vankomycin, teikoplanin), oxazolidinům (linezolid) a streptograminům (quinupristin/dalfopristin). Linezolid, jenž má malou molekulu, dobře proniká do tkání. Relativně dobrá je citlivost ke kotrimoxazolu a rifampicinu (Marek et al., 2010).

S glykopeptidovými antibiotiky je spjato mnoho problémů. Podávají se intravenózně, jsou toxická, a proto se musí pozorně monitorovat jejich hladina v krvi. Navíc glykopeptidy neprocházejí vzhledem ke své velké molekule tak dobře infikovanou tkání, proto se používají pouze na infekce vyvolaných MRSA. Kvůli možnému rozvoji rezistence MRSA kmenů k vankomycinu epidemiologická centra vydala pokyny pro přiměřené používání vankomycinu. První případ intermediárně rezistentního kmene *S. aureus* (VISA) byl zaznamenán v Japonsku v roce 1996, první případ vankomycin rezistentního kmene *S. aureus* (VRSA) byl evidován v roce 2002 (Marek et al., 2010).

U VISA kmenů je citlivost snížena kvůli přestavbě buněčné stěny, která je zesílená a nedovolí tak glykopeptidům inhibovat syntézu peptidoglykanu. VRSA kmeny získaly od enterokoků gen *vanA*, který je zodpovědný za rezistenci na vankomycin. Gen *vanA* je pravděpodobně přenášen transpozomem Tn1546 (Périchon et Courvalin, 2009). Mechanismus rezistence VRSA spočívá v alteraci cílového místa D-alanyl-D-alaninu v D-alanyl-D-laktát, který má redukovanou afinitu k vankomycinu a nedochází tak k inhibici syntézy bakteriální buněčné stěny (Appelbaum, 2006).

Aminoglykosidy jako kanamycin, gentamicin a streptomycin jsou na stafylokokové infekce velmi účinné. Inhibují syntézu bílkovin ireverzibilní vazbou na 30S podjednotku ribosomu. I proti nim se ovšem vyvinulo několik druhů rezistence přenášených na plazmidech. Enzymy modifikující aminoglykosidy inaktivují tato antibiotika kovalentní vazbou buď na fosfáty, nukleotidy nebo poloacetáty na aminové nebo alkoholové funkční části aminoglykosidů. Tímto mechanismem znemožní jejich vazbu na 30S podjednotku ribosomu *S. aureus*. Rezistence k aminoglykosidům může být podmíněna také přítomností efluxních pump (Walsh, 2000).

2.4 Výskyt

S. aureus se vyskytuje hlavně u člověka, ale i zvířat. Až u jedné třetiny lidí žije jako komensál na sliznicích nebo kůži (nejčastěji v podpaží, na nosní sliznici, či na zevním genitálu). Kolonizuje kůži člověka již velmi krátce po narození.

Jedná se o bakterii podmíněně patogenní. Při poruše přirozené imunity však může vyvolat široké spektrum onemocnění, od běžných kožních infekcí, různě těžkých abscesů až po sepse, které mohou končit fatálně.

Poměrně častý je výskyt *S. aureus* v potravinách (v salámech, vepřovém mase, zmrzlině) (Maďar et al., 2006).

2.5 Patogeneze

S. aureus je častým původcem pyogenních infekcí, různých intoxikací, zánětů, abscesů, folikulitid, sinusitid nebo i sepsí. Závažné infekce vyvolává především v traumatizovaných a devitalizovaných tkáních. Z primárního infekčního ložiska se *S. aureus* může šířit hematogenní cestou a vytvářet metastatická ložiska. Má také nemalý podíl na nosokomiálních nálezích (Maar et al., 2006).

Predispozicí ke stafylokokové infekci jsou různá poranění poté, co v ráně zůstane cizí těleso (operace, implantované pomůcky, stehy), dále popáleniny, virové infekce, diabetes mellitus a oslabený imunitní systém (Crossley et al., 2009).

Pro stafylokokové onemocnění je typický absces se světle žlutým, nepáchnoucím hnisem, který je tvořen odumřelými leukocyty a stafylokoky. Absces je obklopen stěnou z fibrinu a fibroblastů, okolní tkáň je zanícena. Příčinou chronických infekcí je pozdní buněčná přecitlivělost vůči stafylokokovým antigenům (Palos, 2009).

Bylo zjištěno, že kmeny *S. aureus*, které způsobují bakteriémie, jsou ve valné většině endogenního původu. Kmeny, které kolonizují nosní sliznici, způsobují bakteriémie zřídka (Eiff et al., 2001). Podle National Nosocomial Surveillance System byl *S. aureus* nejčastěji hlášenou příčinou nosokomiálních infekcí v letech 1996 a 2002 (Crossley et al., 2009).

S. aureus prezentuje na svém povrchu tzv. pathogen associated molecular patterns, které interagují se vzory vystavovanými na povrchu neutrofilů. Tímto způsobem je bakterie bezpečně rozpoznána. Prvním důležitým krokem aktivního boje organismu s bakterií je fagocytóza zprostředkovaná polymorfonukleáry. Ke zvýšení efektivity fagocytózy jsou bakterie opsonizovány komplementem a protilátkami (DeLeo et al., 2009).

Taktéž podle DeLea et al. (2009) kapsulární polysacharidy na povrchu *S. aureus* stimulují CD4 povrchové znaky T lymfocytů, což vede k produkci chemokinů, které zahajují proces infekce v organismu. Další stafylokoková povrchová struktura – peptidoglykan vede k produkci C5a složky komplementu, která aktivuje uvolnění polymorfonukleárů z periferní krve a kostní dřeně. Vylučuje však i vlastní chemokiny (např. phenol soluble modulín-like peptides), které přímo stimulují produkci polymorfonukleárů (DeLeo et al., 2009).

2.6 Patogenita

S. aureus je častým původcem infekcí lokalizovaných v místě průniku do hostitelského makroorganismu. Nejběžnější jsou purulentní onemocnění kůže a jejích adnex, mezi které patří impetigo a folliculitis. *S. aureus* patří mezi hlavní původce závažných komunitních a nosokomiálních onemocnění (Heinige et al., 2009).

Impetigo se nejčastěji vyskytuje u dětí v předškolním věku a velmi snadno se šíří v dětských kolektivech. Bulózní forma impetiga zasahuje jen do epidermis. Postihuje často obličej a končetiny, a to jak kůži zdravou, tak i dříve napadenou ekzémem, odřenou, popálenou nebo se může vyvinout z místa po operaci. Puchýřky na povrchu kůže, papuly, pustuly a vezikuly jsou pokryté typickou žlutohnědou krustou. Připomínají akné, okolní kůže je zarudlá a svědí bez bolestivé reakce (Chiller et al., 2001; Stulberg et al., 2002). Nově vyvinutým lokálním antibiotikem, jež se používá k léčbě impetiga, je retapamulin (Koning et al., 2009).

Ecthyma je vředovité onemocnění kůže, někdy označované jako hlubší forma impetiga. Začíná zpuchýřkovatěním povrchu kůže, které zasahuje i hluboko do dermis, papuly se prohlubují ve vředy, po kterých zůstávají jizvy. Původcem kožních infekcí *impetigo* a *ecthyma* je nejenom *S. aureus*, ale i *Streptococcus pyogenes* (Chiller et al., 2001).

Folliculitis je hnisavá infekce vlasového folikulu. Rozvíjí se z mazové žlázy v nažloutlou pustulu. Často vzniká po odření vlasaté části hlavy či po kousnutí hmyzem. Chronická splývající *folliculitis* ve vousaté oblasti tváře se nazývá *Sycosis barbae*. Léčba je symptomatická, lze použít antibiotické masti. Hlubší forma *folliculitis* se nazývá *Folliculitis decalvans*. Postihuje temeno a vlasatou část hlavy. Zánět vlasových folikulů

působí vypadnutí vlasu a zjizvení povrchu hlavy. Léčba je dlouhodobá a komplikovaná, používá se rifampicin v kombinaci s klindamicinem (Otberg et al., 2008).

Furunculus vzniká při rozšíření zánětu vlasového nebo chlupového folikulu, který vyvolává nekrózu okolní tkáně a šíří se do škóry. Tvoří se hluboký kožní absces i několik centimetrů široký. Hnisavé ložisko s bolestivou reakcí vzniklé splnutím několika furunklů se nazývá **carbunculus** (Chiller et al., 2001).

Anderson et Kaye (2007) uvádí, že *S. aureus* je zodpovědný za 20 % **pooperačních infekcí ran**. Dalšími původci infekcí po operačních zákrocích jsou koaguláza-negativní stafylokoky (14 %), enterokoky (12 %) nebo *Pseudomonas aeruginosa* (8 %). *S. aureus* zanesený do rány pochází většinou z endogenní mikroflóry pacienta, méně z prostředí operačního sálu. Vyšší riziko rozvoje infekce po operačním zákroku hrozí zejména starším a/nebo imunokompromitovaným pacientům (Anderson et Kaye, 2007). Těžké pooperační infekce, které postihují svaly a jejich fascie mohou proniknutím bakterií do krevního oběhu s následnou bakteriémií a sepsí končit fatálně.

S. aureus je původcem onemocnění **Hordeolum** (ječné zrno). Jde o zánět mazové žlázy některé z řas (nejčastěji Zeisovy mazové žlázy). Při zanícení se žláзка začne zvětšovat a uvnitř se tvoří hnis. Typickými lokálními příznaky jsou zarudnutí, otok a bolestivá reakce. Zanesení *S. aureus* do zaníceného očního víčka může vyústit v *Blepharitis ulcerosa*, která se projevuje jako zarudnutí, zduření a zhnisání okrajů očních víček. **Conjunctivitis** neboli zánět spojivek může taktéž způsobit *S. aureus* (Vymlátil, 1998).

S. aureus je příčinou onemocnění **mastitis**, zánětu parenchymu prsní žlázy. Postihuje zvláště ženy během kojení (2 – 3 týden kojení). K propuknutí infekce přispívá ucpání mlékovodů z důvodu špatné techniky kojení nebo stresu. Prs je bolestivý a zarudlý. Kojence se doporučuje neodstavovat, právě naopak pravidelné kojení může odstranit překážku v mlékovodu. Antibiotika v drtivé většině případů nejsou potřeba. Cílem léčby je především zabránit komplikacím a návratu zánětu (Barbosa-Cesnik et al., 2003).

Osteomyelitis je hnisavý proces v kosti, který může vyvolat *S. aureus*. Často postihuje děti předškolního věku, u nichž vzniká hematogenně. Bakterie *S. aureus* se mohou rozšířit přes růstovou chrupavku, která je ještě bohatě prokrvena, do kloubu. Takto se z *osteomyelitis* vyvíjí **arthritis**.

Postihuje i dospělou populaci, kde se onemocnění vyvíjí přestupem z jiného infekčního ložiska, či přímým zavlečením MO při traumatu nebo operaci. Infekce nejčastěji probíhá v metafýzách dlouhých kostí. U dospělých mohou být postiženy i obratle. Klinickými příznaky jsou vysoké teploty, třesavka, zvracení a bolest postižené kosti (Brandy, 2007).

S. aureus je významným původcem **alimentárních intoxikací**, za které jsou zodpovědné termostabilní enterotoxiny produkované při množení *S. aureus*. Intoxikace vzniká po požití potravin (salátů, cukrovinek), ve kterých je přítomen enterotoxin. Stafylokoková enterotoxikóza se projevuje nevolností, zvracením, bolestmi břicha, průjmem a bolestmi hlavy. Příznaky onemocnění se objevují za 1-6 hodin po konzumaci potravin v důsledku stimulace zakončení *nervus vagus* v oblasti žaludku.

Exfoliativní toxiny A a B (ETA) a (ETB) *S. aureus* svým působením vyvolávají závažné kožní onemocnění zvané **stafylokokový syndrom opařené kůže** (Alouf et Müller–Alouf, 2003). Je charakterizováno vznikem puchýřků a výrazným odlupováním velkých částí kůže, postiženy jsou i sliznice.

Syndrom toxického šoku vyvolává toxin syndromu toxického šoku (TSST-1), který jako superantigen v organismu navodí mohutnou imunitní reakci. Superantigeny se váží na MHC 2. třídy a zároveň na T-lymfocyty. To vede k stimulaci celé řady klonů T-lymfocytů, tzv. nespecifická polyklonální aktivace T-lymfocytů. Projevuje se typickými příznaky šokového stavu infekčního původu, tedy horečkou, poklesem krevního tlaku a zrychleným pulsem. Často dochází i k odlupování velkých částí kůže. Selhání základních životních funkcí a metabolický rozvrat vede bez léčby k poruše vědomí a následně ke smrti (Roztočil et Bartoš, 2011).

3 LABORATORNÍ DIAGNOSTIKA

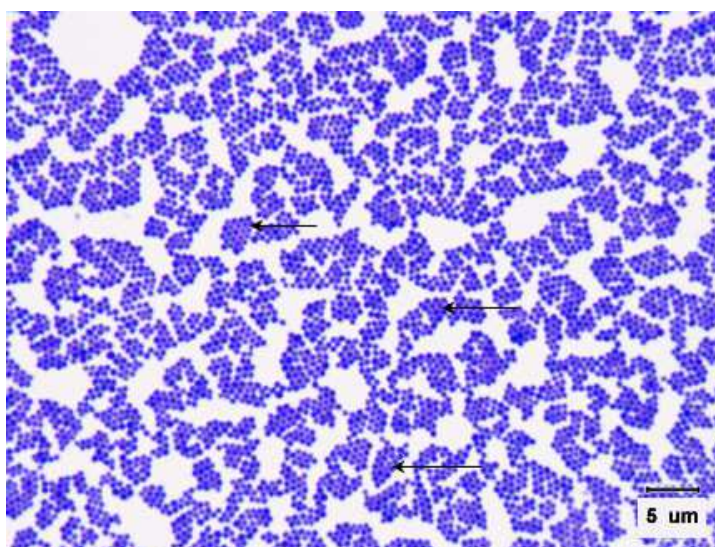
3.1 Vyšetřovaný materiál

Základním diagnostickým materiálem je hnis, nejlépe tekutý. Z hnisu se zhotovuje mikroskopický preparát. Stěr z hnisajícího ložiska není vhodný. Výtěr se provádí výtěrovými tampony ze spojivkového vaku nebo ucha. Při podezření na septikémii se odebírá krev. Před odběrem krve se v místě vpichu provede stěr, který se také posílá na kultivaci. Moč se odebírá v množství 3-5 ml do sterilní zkumavky. Sputum se získá

vykašláním do speciální odběrové nádoby (sputovky). Vyšetřovaným materiálem mohou být i aspiráty, punktáty či mozkomíšni mok.

3.2 Mikroskopické vyšetření

Buňky *S. aureus* jsou grampozitivní, kataláza pozitivní a oxidáza negativní koky o průměru přibližně 1 μm , mikroskopicky špatně odlišitelné od ostatních grampozitivních koků. Stafylokoky mají charakteristické uspořádání do shluků (viz obrázek 4). Koky jsou nepohyblivé a nesporulující.



Obrázek 4: Preparát *S. aureus* barvený podle Grama
(Kaiser, 2009)

3.3 Kultivace

Nejvhodnějším a nejběžnějším kultivačním médiem pro *S. aureus* je krevní agar. K agarovému základu se přidá 5-10 % defibrinované beraní nebo koňské krve. Po 24 hodinové inkubaci při 37 °C *S. aureus* vyrůstá ve smetanových až žlutých koloniích s pravidelnými okraji a většinou se zónou úplné hemolýzy, na kterou může nasedat hemolýza neúplná.

Stafylokoky vyrůstají také na masopeptonovém agaru, který obsahuje extrakt z hovězího masa, pepton, chlorid sodný, vodu a 1,5–2 % agaru. Po 24 hodinách inkubace při 37 °C lze pozorovat nárůst 1–3 mm velkých, hladkých kolonií s rovným okrajem, nazlátlým pigmentem a krémovou konzistencí.

Pokud je předpoklad, že vyšetřovaný materiál bude kontaminovaný, lze *S. aureus* kultivovat na selektivní slaný agar s mannitolem, obsahující hovězí extrakt, 7,5 % NaCl,

mannitol a fenolčerveň. *S. aureus* štěpí mannitol a roste na této půdě v lesklých žlutých koloniích se žlutými dvorci. Je to proto, že fermentací mannitolu se snižuje pH média a tím dochází k barevné změně fenolové červeň z červené na žlutou. Vysoká koncentrace NaCl působí inhibičně na doprovodnou mikroflóru (Votava et al., 2000).

Pro izolaci *S. aureus* z kontaminovaných vzorků je rovněž vhodný Baird–Parkerův agar, který obsahuje chlorid lithný a telluričitan draselný jako inhibitory a vaječný žloutek k detekci produkce lecithinázy. Růstem kolonie dochází k redukci telluričitanu na kovový tellur, kolonie proto jsou tmavě zelené až černé. Stafylokoky, které produkují lecithinázu rozkládají vaječný žloutek a tím vzniká zóna projasnění kolem kolonií. Lipázy naopak způsobují neprůhlednou zónu precipitace (Corry et al., 2003).

3.4 Screeningové a biochemické testy

Vázaná koaguláza (clumping faktor) je antigen na povrchu *S. aureus*, jež napomáhá shlukování bakteriálních buněk. V kapce králičí plasmy na podložním sklíčku se resuspenduje několik kolonií *S. aureus* a do několika vteřin dojde ke shlukování.

Volná koaguláza je oproti vázané koaguláze extracelulární enzym, který v králičí plazmě přeměňuje rozpustný fibrinogen na fibrin, čímž dojde k polymeraci a ztuhnutí plazmy. V králičí plazmě se rozmíchá několik bakteriálních kolonií a po 4hodinové inkubaci při 37 °C se ve zkumavce pozoruje ztuhnutí plazmy, případně tvorba chuchvalců sraženiny.

Průkaz proteinu A a kapsulárních polysacharidů je založen na latexové aglutinaci, je rychlý a jednoduchý. Na podložní sklíčko se nanese dvě kapky: roztok s latexovými částicemi, na kterých jsou protilátky proti proteinu A, vázané koaguláze a kapsulárním polysacharidům *S. aureus*, který se smíchá s bakteriální suspenzí. V pozitivním případě dochází k aglutinaci. Latexová aglutinace dnes nahrazuje starší biochemické testy používané k identifikaci *S. aureus*, zejména průkaz DNázy a hyaluronidázy.

Dekapsulační test se provádí na krevním agaru, na který se naočkuje bakterie, jejíž pouzdro je tvořeno kyselinou hyaluronovou (např. *Pasteurella multocida*). K naočkované čáře opouzdřené bakterie se naočkuje čára *S. aureus* a půda se nechá inkubovat. Hyaluronidáza, kterou produkuje *S. aureus*, rozloží pouzdro opouzdřené bakterie, čímž dojde ke změně její růstové fáze na S-fázi.

Biochemickým testem, kterým lze odlišit *S. aureus* od *S. intermedius* je VP test (Voges Proskauer test). VP testem se prokazuje tvorba acetoinu. *S. aureus* produkuje acetoin, *S. intermedius* nikoliv. Často používané jsou komerčně dostupné biochemické sety v mikrotitračních destičkách, které v jamkách obsahují různé dehydratované substráty, nejčastěji sacharidy, spolu s vhodnými acidobazickými indikátory.

3.5 Molekulárně biologické metody

Jedná se o metody umožňující moderní způsob identifikace bakterií. Dnes je nejpoužívanější vysoce citlivá metoda polymerázové řetězové reakce (PCR), zejména pro identifikaci genů kódujících stafylokokové enterotoxiny A až E (*entA*, *entB*, *entC*, *entD* a *entE*), toxin toxického šokového syndromu (*tst*), exfoliativní toxiny A a B (*etaA* a *etaB*) a k detekci genu *mecA* pro rezistenci k methicilinu (Menthora, 2000).

Principem PCR je mnohonásobné zmožení vybraného úseku DNA pomocí enzymu DNA polymerázy v cyklické reakci o třech teplotních fázích. Cílové úseky DNA musí být na začátku a na konci ohraničeny tzv. primery. Metoda je velmi citlivá a specifická (Paulík et al., 2005).

3.6 Fagotypizace

Fagotypizace se používá zejména k epidemiologickým účelům. U kmenů *S. aureus* se provádí se souborem 23 bakteriofágů Mezinárodní typizační řady (IPTS – International Phage Typing Set). Kmeny *S. aureus* jsou definovány podle jejich citlivosti vůči bakteriofágům, kterým jsou vystaveny (Varga, 2009). Fagotypizace u druhu *S. aureus* je komplikována jeho lysogenní aktivitou, kdy se do jeho genetické informace zapojují profágy (DNA restrikce). Fagotypy tedy nejsou stálé. Na druhé straně existují kmeny *S. aureus*, které nepatří mezi žádné fagotypy. Kvůli této variabilitě má fagotypizace omezené využití (Fischetti, 2000).

3.7 Metody nepřímého průkazu

Jedná se o průkaz protilátek proti antigenům a faktorům virulence (hemolyzinům, hyaluronidáze, leukocidinu) metodou precipitace, komplement-fixační reakce nebo enzymové imunoanalýzy (Toman et al., 2009).

Komplement-fixační reakce je sérologická metoda, při které se přítomnost protilátek proti příslušnému antigenu prokazuje vyvazováním komplementu na komplexy

antigen-protilátka. Poté je stanovena hemolytická aktivita fixovaného komplementu, která je úměrná množství antigenu. Test je nepřesný, pracný a neumožňuje rozlišit jednotlivé třídy protilátek. Jeho výhodou je však nízká cena a nízké nároky na vybavení laboratoře. Používá se především ve screeningové diagnostice (Paulík et al., 2005).

Podstatou enzymové imunoanalýzy je opět reakce antigenu s protilátkou, jeden z reaktantů je enzymaticky značený (peroxidáza, alkalická fosfatáza). Podle povahy substrátu je možno reakci detekovat spektrofotometricky, nefelometricky nebo fluorometricky. Metody existují v řadě modifikací, jsou velmi citlivé a umožňují rozlišit jednotlivé třídy protilátek (Paulík et al., 2005).

4 TERAPIE

Povrchové infekce se hojí spontánně, lze užít lokální antibiotikum (ATB), případný absces je nutné otevřít a zajistit drenáž. Hluboká ložiska generalizované infekce vyžadují chirurgický zákrok a celkovou ATB terapii. U toxického šokového syndromu je důležitá včasná léčba šoku a okamžité podání protistafylokokových ATB, nejlépe jejich trojkombinace. U exfoliativní epidermolýzy je třeba ošetření kožních lézí za cílené ATB terapie. V případě enterotoxikóz je žádoucí symptomatická léčba, hlavně rehydratace organismu.

4.1 Antibiotika

K léčbě infekcí vyvolaných bakterií *S. aureus* se používají vysoce efektivní antibiotika oxacilin nebo kloxacilin z třídy penicilinů (Blot et al., 2002). Oxacilin je beta-laktamové polysyntetické antibiotikum s úzkým spektrem účinku, podobné methicilinu. Kloxacilin je díky své struktuře odolný vůči beta-laktamázám, obsahuje velký řetězec R, který beta-laktamázám nedovoluje vázat se na beta-laktamový kruh.

Krátce po zavedení penicilinu se objevily kmeny *S. aureus* produkující penicilinázu, dnes už je těchto kmenů v nemocnicích většina. V USA bylo do roku 2006 jen 5 % kmenů *S. aureus* citlivých k penicilinu (Mađar et al., 2006). Z mezinárodních studií vyplývá, že země s nízkou spotřebou antibiotik, které používají převážně základní peniciliny, mají minimální problémy s antibiotickou rezistencí. V České republice v posledních letech naopak antibiotická rezistence vzrůstá (Hoza et al., 2002).

Ve světě i u nás stoupá prevalence methicilin rezistentních kmenů *S. aureus*. První kmeny MRSA se objevily už v roce 1961, rozšíření v nemocnicích nastalo hlavně koncem 70. a počátkem 80. let 20. století (Mađar et al., 2006). V ČR byly izolovány první MRSA

v roce 2003. Kmeny MRSA jsou u nás vždy současně rezistentní k makrolidům, fluorochinolonům, jedná se tedy o multirezistentní kmeny (Marek et al., 2010). K léčbě infekcí způsobených MRSA kmeny se nejčastěji používá vankomycin, linezolid nebo imipenem (Maďar et al., 2006). Za zvýšením výskytu MRSA je zřejmě odpovědné časté užívání až nadužívání širokospektrých antibiotik (Lee et al., 2007).

Vzhledem k opakovaně se objevujícím kmenům vankomycin intermediárně rezistentních kmenů *S. aureus* a vankomycin rezistentní kmenů *S. aureus* a také jeho vysoké toxicitě se od používání vankomycinu upouští. V červnu roku 2002 byl vykultivován VRSA s rezistencí i k teikoplaninu. Kmen VRSA obsahoval gen *vanA*, determinující rezistenci k vankomycinu a teikoplaninu a gen *mecA* zodpovědný za rezistenci stafylokoků k beta-laktamovým antibiotikům (Marečková, 2006).

Nově byl k léčbě infekcí vyvolaných methicilin citlivými kmeny *S. aureus* (MSSA), ale i MRSA infekcí, zaveden linezolid z třídy oxazolidinonů, který díky své malé molekule lehce proniká do tkání (Marek et al., 2010). K terapii MSSA lze použít i beta-laktamová antibiotika v kombinaci s inhibitory beta-laktamázy, jako např. augmentin (amoxicillin + klavulanát) nebo timentin (tikarcilin + klavulanát). Dále lze podávat na základě výsledků testování citlivosti i cefalosporiny 3. generace a fluorochinolony (Schindler, 2010).

Při použití antibiotik inhibujících buněčnou stěnu je *S. aureus* schopen pomocí regulátorů, které řídí expresi faktorů virulence, aktivovat tzv. cell wall stress stimulon (CWSS), který má ochrannou funkci. Indukce CWSS je realizována VraSR systémem. Antibiotika indukující aktivaci CWSS jsou bacitracin, D-cycloserin, teikoplanin a vankomycin (Dengler et al., 2011).

5 ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce bylo zpracovat literární rešerši na téma „Faktory virulence *Staphylococcus aureus*“.

S. aureus je běžně se vyskytující lidský patogen, který způsobuje zejména kožní infekce. U oslabených jedinců je však schopen vyvolat široké spektrum onemocnění, mohou to být ranné infekce, toxikózy, sepse a různá další. V patogenezi těchto infekcí mají stěžejní význam faktory virulence *S. aureus*. Povrchových faktorů virulence využívá hlavně k adhezi k epiteliálním buňkám hostitelského organismu. Dále uvolňuje do svého

okolí mnoho extracelulárních faktorů virulence, jež slouží k invazi do tkání, úspěšné propagaci a množení stafylokoků.

V současné době se v souvislosti s infekcemi *S. aureus* řeší zejména rezistence k antibiotikům, tvorba biofilmu a intracelulární přežívání. Další výzkum faktorů virulence by mohl významně přispět k zefektivnění terapie stafylokokových infekcí.

SEZNAM LITERATURY

1. ACTON, Q. A. *Staphylococcus aureus: Advances in Research and Treatment: 2011 Edition*. Atlanta : Scholarly Editions, 2011. 140 s. ISBN 978-1-4649-2743-0.
2. ALOUF, J. E. et MÜELLER–ALOUF, H. Staphylococcal and streptococcal superantigens: molecular, biological and clinical aspects. *International Journal of Medical Microbiology*, 2003, roč. 292, s. 429-440. ISSN 1438-4221.
3. ALY, R. et al. Role of Teichoic Acid in the Binding of *Staphylococcus aureus* to Nasal Epithelial Cells. *Journal of Infectious Diseases*, 1980, roč. 141, č. 4, s. 463-465. ISSN 0022-1899.
4. ANDERSON, D. J. et KAYE, K. S. Skin and Soft Tissue Infections in Older Adults. *Clinics in Geriatric Medicine*, 2007, roč. 23, s. 599 - 610. ISSN 0749-0690.
5. APPELBAUM, P. C. The emergence of vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clinical Microbiology and Infection*, 2006, roč. 12, č. S1, s. 16-23. ISSN 1469-0691.
6. ARIYANTI, D.; SALASIA, S. I. O. et TATO, S. Characterization of Haemolysis of *Staphylococcus aureus* Isolated from Food of Animal Origin. *Indonesian Journal of Biotechnology*, 2011, roč. 16, č. 1, s. 32-37. ISSN 0853-8654.
7. ATLAS, R. M. *Principles of Microbiology*. 2. vyd. Kentucky : William C Brown Publishing, 1996. 1298 s. ISBN 978-0815108894.
8. BARBOSA-CESNIK, C.; SCHWARTZ, K. a FOXMAN, B. Lactation Mastitis. *The Journal of American Medical Association*, 2003, roč. 289, č. 13, s. 1609-1612. ISSN 0002-9955.
9. BECKER, K. et al. Development and Evaluation of a Quality-Controlled Ribosomal Sequence Database for 16S Ribosomal DNA-Based Identification of *Staphylococcus* Species. *Journal of Clinical Microbiology*, 2004, roč. 42, č. 11, s. 4988 – 4995. ISSN 0983-8512.

10. BERENDS, E. T. et al. Nuclease expression by *Staphylococcus aureus* facilitates escape from neutrophil extracellular traps. *Journal of Innate Immunity*, 2010, roč. 2, č. 6, s. 576-586. ISSN 1662-8128.
11. BESIER, S., SMACZNY, C. et MALLINKRODT, C. Prevalence and Clinical Significance of *Staphylococcus aureus* Small-Colony Variants in Cystic Fibrosis Lung Disease. *Journal of Clinical Microbiology*, 2006, roč. 45, s. 168 – 172. ISSN 0095-1137.
12. BLANCO, L. et al. Mutants of staphylococcal toxic shock syndrome toxin 1: mitogenicity and recognition by a neutralizing monoclonal antibody. *Infection and Immunity*, 1990, roč. 58, č. 9, s. 3020-3028. ISSN 0019-9567.
13. BLOT, S. I. et al. Outcome and attributable mortality in critically ill patients with bacteremia involving methicilin-susceptible and methicilin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Archives of Internal Medicine*, 2002, roč. 167, s. 2229–2235. ISSN 0003-9926.
14. BOLES, B. R. et HORSWILL, A. R. agr-Mediated Dispersal of *Staphylococcus aureus* Biofilms. *PLoS Pathogens*, 2008, roč. 4, č. 4. ISSN 1553-7374.
15. BRADY, R. *Staphylococcus aureus* Osteomyelitis: Characterization of Bacterial Antigens and Utilization as Vaccine Candidates and Imaging Targets. Disertační práce, 2007. 211 s.
16. CORRY, J. E. L.; CURTIS, G. D. W. et BAIRD, R. M. *Handbook of Culture Media for Food Microbiology*. Elsevier, 2003. 662 p. ISBN: 0-444-51084-2.
17. CROSSLEY, K. B. et al. *Staphylococci in Human Disease*. 2. vyd. Singapore : Willey-Blackwell, 2009. 640 s. ISBN: 978-1-4051-6332-3.
18. ČÍŽEK, A. Praktikum z veterinární mikrobiologie [online]. [vid. 2012-06-20]. Dostupné z www: http://fv1.vfu.cz/sekce_ustavy/mikrobiologie/obrazova_priloha/mikrob/img/13-06.jpg.
19. DAS, A. K.; MUKHERJEE, S. et DHAR, R. Analyzing the catalytic mechanism of protein tyrosine phosphatase PtpB from *Staphylococcus aureus* through site directed mutagenesis. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2009, roč. 45, s. 463-469. ISSN 0141-8130.

20. DeLEO, F. R.; DIEP, B. A. et OTTO, M. Host Defense and Pathogenesis in *Staphylococcus aureus* infections. *Infectious Disease Clinics North America*, 2009, roč. 23, č. 1, s. 17-34. ISSN 0891-5520.
21. DENGLER, V. et al. Induction kinetics of the *Staphylococcus aureus* cell wall stress stimulon in response to different cell wall active antibiotics. *BMC Microbiology*, 2011, roč. 11, s. 1-11. ISSN 1471-2180.
22. DEURENBERG, R. H. et al. The molecular evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clinical Microbiology and Infection*, 2007, roč. 13, č. 3, s. 222-235. ISSN 1469-0691.
23. DINGES, M. M.; ORWIN, P. M. et SCHLIEVERT, P. M. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clinical Microbiology Reviews*, 2000, roč. 13, č. 1, s. 16-34. ISSN 0983-8512.
24. DHOPLE, V. M. et NAGARAJ, R. Conformation and activity of delta-lysin and its analogs. *Peptides*, 2005, roč. 26, č. 2, s. 217-225. ISSN 0196-9781.
25. DRAPEAU, G. R.; BOILY, Y. et HOUMARD, J. Purification and Properties of an Extracellular Protease of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Biological Chemistry*, 1972, roč. 247, s. 6720 – 6726. ISSN 0021-9258.
26. DVOŘÁKOVÁ M. Genomové projekty řešené v rámci rodu *Staphylococcus*. Brno: Masarykova univerzita, 2008. 29 s.
27. DWORKIN, M. et al. *The Prokaryotes*. 3. vyd. New York : Springer, 2006. ISBN 978-0387254951.
28. EIFF, C. et al. Nasal carriage as a source of *Staphylococcus aureus* bacteremia, *The New England Journal of Medicine*, 2001. roč. 344, s. 11-16. ISSN 0028-4793.
29. EUZÉBY, J. P. Rod *Staphylococcus* [online]. [vid. 25. 6. 2012]. Dostupné z [www: http://www.bacterio.cict.fr/s/staphylococcus.html](http://www.bacterio.cict.fr/s/staphylococcus.html).
30. FALLON, P. G. *Advances in experimental medicine and biology: Pathogen derived Immunomodulatory molecules*. 2009, 183 s, ISBN: 978-1-4419-1600-6.

31. FISCHETTI, V. A. *Gram-Positive Pathogens*, ASM Press, 2000. 735 s. ISBN 978-1555811662.
32. GHUYSEN, J. M. et HAKENBECK, R. *Bacterial cell wall*. Amsterdam : Elsevier Science Ltd., 1994. 606 s. ISBN: 0-444-88094-1.
33. GROSS, M. et al. Key Role of Teichoic Acid Net Charge in *Staphylococcus aureus* Colonization of Artificial Surfaces. *Infection and Immunity*, 2001, roč. 69, č. 5, s. 3423-3426. ISSN 0019-9567.
34. GRAILLE, M. et al. Crystal structure of a *Staphylococcus aureus* protein A domain complexed with the Fab fragment of a human IgM antibody: Structural basis for recognition of B-cell receptors and superantigen activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000, roč. 97, č. 10, s. 5399-5404. ISSN 0027-8424.
35. HAGAN, W. A. et al. *Hagan and Bruner's Microbiology and infectious Diseases of domestic animals*. Cornell University Press, 1988, 912 s. ISBN 978-0801418969.
36. HART, E. M., HART, J. M. et ROOP, J. A. Genotypic and Phenotypic Assessment of Hyaluronidase among Type Strains of a Select Group of Staphylococcal Species, *International Journal of Microbiology*, 2009, roč. 2009. ISSN 1687-918X.
37. HEINIGE, P. et al. Nekrotizující pneumonie kojence s fatálním průběhem, způsobená PVL pozitivním zlatým stafylokokem. *Pediatric pro praxi*, 2009, roč. 10, č. 5, s. 326-328. ISSN 1213-0494.
38. HOLOCHOVÁ P. et al. Genomic diversity of two lineages of exfoliative toxin A – converting phages predominating in *Staphylococcus aureus* strains in the Czech Republic. *Research in Microbiology*, 2010, roč. 161, č. 4, s. 260-267. ISSN 0923-2508.
39. HONEYMAN, A.; FRIEDMAN, H. et BENDINELLI, M. *Staphylococcus aureus Infection and Disease*. New York : Kluwer Academic/Plenum Publisher, 2001. 342 s. ISBN: 0-306-46951-4.

40. HOZA, J.; JINDRÁK, V. et MAREŠOVÁ, V. Konsensus používání antibiotik I. Penicilinová antibiotika [online]. 2002 [2012-06-11]. Dostupné z [www: www.cls.cz/dokumenty/atb_konsensus02.doc](http://www.cls.cz/dokumenty/atb_konsensus02.doc).
41. CHAIGNON, P. et al. Susceptibility of staphylococcal biofilms to enzymatic treatments depends on their chemical composition. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, roč. 75, s. 125-132. ISSN 1432-0614.
42. CHILLER, K.; SELKIN, B. A. et MURAKAWA, G. J. Skin Microflora and Bacterial Infections of the Skin. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*, 2001, roč. 6, s. 170 – 174. ISSN 1087-0024.
43. IANDOLO, J. J. Genetic analysis of extracellular toxins of *Staphylococcus aureus*. *Annual Review of Microbiology*, 1989, roč. 43, s. 375-402. ISSN 0066-4227.
44. JOSEFSSON, E. et al. In vivo sortase A and clumping factor A mRNA expression during *Staphylococcus aureus* infection. *Microbial Pathogenesis*, 2007, roč. 44, č. 2, s. 103-110. ISSN 0882-4010.
45. KAISER, G. E. *Staphylococcus aureus* [online]. 2009 [vid. 2012-06-20]. Dostupné z [www: http://faculty.ccbcmd.edu/courses/bio141/labmanua/lab15/images/Saureus03_scale.jpg](http://faculty.ccbcmd.edu/courses/bio141/labmanua/lab15/images/Saureus03_scale.jpg).
46. KATZIF, S. et al. *CspA* Regulates Pigment Production in *Staphylococcus aureus* through a SigB-Dependent Mechanism. *Journal of Bacteriology*, 2005, roč. 187, č. 23, s. 8181-8184. ISSN 0021-9193.
47. KONING, S. et al. Interventions for impetigo. *Cochrane Database System Review*, 2009. 97 s. ISSN 1469-493X.
48. KUMAR, R. et al. Molecular surveillance of putative virulence factors and antibiotic resistance in *S. aureus* isolates recovered from intra-mammary infections of river buffaloes, *Microbial Pathogenesis*, 2011, roč. 51, č. 1-2, s. 31-38. ISSN 0882-4010.
49. KVAEG, J. K. Description of the 12 bacterial genes identified by the PCR test, *Videncentret for Landbrug* [online]. 2001 [vid. 2012-06-29]. Dostupné z [www: http://www.landbrugsinfo.dk/Kvaeg/Maelke kvalitet/Sider/Description-of-the-12-bacterial-genes-identified-by-the-PCR-test.aspx](http://www.landbrugsinfo.dk/Kvaeg/Maelke kvalitet/Sider/Description-of-the-12-bacterial-genes-identified-by-the-PCR-test.aspx).

50. LADHANI, S. et al. Clinical, microbial, and biochemical aspects of the exfoliative toxins causing staphylococcal scalded-skin syndrome. *Clinical Microbiology Reviews*, 1999, roč. 12, s. 224-242. ISSN 0893-8512.
51. LETERTRE, C. et al. Identification of a new putative enterotoxin SEU encoded by the *egc* cluster of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Applied Microbiology*, 2003, roč. 95, č. 1, s. 38-43. ISSN 1365-2672.
52. LEE, S. S. et al. Rapid spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a new hospital in the broad-spectrum antibiotic era. *Journal of Infection*, 2007, roč. 55, s. 358-362. ISSN 1876-0341.
53. LIJNEN, H. R. et al. On the Mechanism of Fibrin-specific Plasminogen Activation by Staphylokinase. *Journal of Biological Chemistry*, 1991, roč. 266, č. 18, s. 11826-11832. ISSN 0021-9258.
54. LIU, G. Y.; ESSEX, A. et BUCHANNAN, J. T. *Staphylococcus aureus* golden pigment impairs neutrophil killing and promotes virulence through its antioxidant activity. *The Journal of Experimental Medicine*, 2005, roč. 202, s. 206 – 215. ISSN 1540-9538.
55. LOWY, F. D. *Staphylococcus aureus* Infections. *The New English Journal of Medicine*, 1998, roč. 339, s. 520-532. ISSN 1533-4406.
56. MAĐAR, R., PODSTATOVÁ, R. et ŘEHOŘOVÁ, J. *Prevence nozokomiálních nákaz v klinické praxi*. Praha : Grada Publishing, 2006. 178 s. ISBN 978-80-247-6277-7.
57. MAREČKOVÁ, J. *Ošetrovatelské diagnózy v NANDA doménách*. Praha : Grada Publishing, 2006, 264 s. ISBN 80-247-1399-3.
58. MAREK, J. et al. *Farmakologie vnitřních nemocí*. Praha : Grada Publishing, 2010, 777 s. ISBN: 978-80-247-2639-7.
59. MARTIN, S. E. et BARRIER, W. A. Influence of salt, pH and temperature on *Staphylococcus aureus* MF-31 catalase. *Food Microbiology*, 1990, roč. 7, č. 2, s. 120-127. ISSN 0740-0020.
60. McADOW, M.; MISSIAKAS, M. D. et SCHNEEWIND, O. *Staphylococcus aureus* Secretes Coagulase and von Willebrand Factor Binding Protein to Modify the Coagulation

Cascade and Establish Host Infections. *Journal of Innate Immunity*, 2012, roč. 4, č. 2, s. 141–148. ISSN 1662-8128.

61. MENTHORA, M. et al. Multiplex PCR for Detection of Genes for *Staphylococcus aureus* Enterotoxins, Exfoliative Toxins, Toxic Shock Syndrome Toxin 1, and Methicillin Resistance. *Journal of Clinical Microbiology*, 2000, roč. 38, č. 1032–1035. ISSN 0095-1137.

62. MONGODIN, E. et al. Fibronectin-Binding Proteins of *Staphylococcus aureus* Are Involved in Adherence to Human Airway Epithelium. *Infection and Immunity*, 2002, roč. 70, č. 2, s. 620-630. ISSN 0019-9567.

63. OCHEI, J. et al. *Medical Laboratory Science: Theory and Practice*. Tata McGraw-Hill Education, 2000. 1339 s. ISBN 978-007-463223-9.

64. O'RIORDAN, K. et LEE, J. C. *Staphylococcus aureus* Capsular Polysaccharides. *Clinical Microbiology Reviews*, 2004, roč. 17, č. 1, s. 218 – 234. ISSN 0893-8512.

65. OTBERG, N. et al. Folliculitis decalvans. *Dermatologic Therapy*, 2008, roč. 21, č. 238 – 244. ISSN 1529-8019.

66. PALOS, M. Léčba chronické blefaritidy, *Klinická Farmakologie a Farmacie*, 2009, roč. 23, č. 3, s. 120 – 124. ISSN 1212-7973.

67. PAULÍK, M. et al. Vyšetřovací metody v imunologii, *Grada Publishing*, 2005, 176 s., ISBN: 978-80-247-3533-7

68. PÉRICHON, B. et COURVALIN, P. VanA-Type Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2009, roč. 53, s. 4580 – 4587. ISSN 0066-4804.

69. PETRÁŠ P. Nový "český" stafylokok, *Staphylococcus microti*. *Informace z NRL a odborných pracovišť SZÚ*, 2010, roč. 19, s. 37-39.

70. PETRÁŠ, P. et al. Další smrtelný případ pneumonie vyvolaný kmenem *S. aureus* s produkcí Pantonova –Valentinova leukocidinu. *Zprávy z Centra epidemiologie a mikrobiologie (SZÚ, Praha)*, 2009, roč. 18, s. 15-17. ISSN 1211-7358.

71. ROLLOF, J. et NORMARK, S. In Vivo Processing of *S. aureus* Lipase. *Journal of Bacteriology*, 1992, roč. 174, č. 6, s. 1844-1847. ISSN 0021-9193.
72. ROZTOČIL, A. et BARTOŠ, P. *Moderní gynekologie*. Praha : Grada Publishing, 2011. 528 s., ISBN 978-80-247-2832-2.
73. SCHINDLER, J. *Mikrobiologie pro studenty zdravotních oborů*. Praha : Grada Publishing, 2010, 248 s. ISBN 978-80-247-3170- 4.
74. SILVA, E. R. et al. Hemolysin production by *Staphylococcus aureus* species isolated from mastitic goat milk in Brazilian dairy herds. *Small Ruminant Research*, 2004, roč. 56, č. 1, s. 271-275. ISSN 0921-4488.
75. STEWART, P. H. et COSTERTON, J. W. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *The Lancet*, 2001, roč. 358, s. 135-138. ISSN 0140-6736.
76. STULBERG, D. L.; PENROD, M. A. et BLATNY, R. A. Common Bacterial Skin infections. *American Family Physician*, 2002, roč. 666, s. 119-124. ISSN 0002-838X.
77. TOMAN, M. et al. *Veterinární imunologie*. Praha : Grada Publishing, 2009. 392 p. ISBN 978-247-2464-5.
78. VATH, G. M. et al. The structure of the superantigen exfoliative toxin A suggests a novel regulation as a serine protease. *Biochemistry*, 1997, roč. 36, s. 1559-1566. ISSN 0006-2960.
79. VARGA, M. Transdukce plazmidů zprostředkovaná profágy kmenů *Staphylococcus aureus*. Diplomová práce. Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Brno. 2009.
80. VOS P. et al. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Volume 3: The Firmicutes*. 2. vyd. New York : Springer-Verlag, 2009. 1450 s. ISBN 978-0-387-95041-9.
81. VOTAVA, M. et al. *Kultivační půdy v lékařské mikrobiologii*. Brno : Hortus, 2000. ISBN 80-238-5058-X.
82. VOTAVA, M. et al. *Lékařská mikrobiologie speciální*. Brno : Neptun, 2003. 495 s. ISBN: 80-902896-6-5.

83. VYMLÁTIL J. Co to je, když se řekne... Ječné zrno. *Remedia Populi*, 1998, roč. 2, s. 34, ISSN 1212-4230.
84. WALEV, I. et al. Selective Killing of Human Monocytes and Cytokine Release Provoked by Sphingomyelinase (Beta-Toxin) of *Staphylococcus aureus*. *Infections and immunity*, 1996, roč. 64, č. 8, s. 2974-2978. ISSN 0019-9567.
85. WALSH, C. Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. *Nature*, 2000, roč. 406, s. 775-781. ISSN 0028-0836.
86. YAMAGUCHI, T. et al. Phage conversion of exfoliative toxin A production in *Staphylococcus aureus*. *Molecular Microbiology* , 2000, roč. 38, s. 694-705. ISSN 1365-2958.