

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Metody detekce toxinů tvořených bakterií *Staphylococcus aureus*

Ivana Řičičářová

Bakalářská práce

2019

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Ivana Řičičářová**
Osobní číslo: **C16430**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**
Název tématu: **Metody detekce toxinů tvořených bakterií *Staphylococcus aureus***
Zadávající 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 :

1. Seznamte se s literárními prameny v dané oblasti a vypracujte rešerši na zadané téma. V úvodu práce se věnujte shrnutí základních informací o bakterii *Staphylococcus aureus*.
2. Vypracujte přehled toxinů tvořených bakterií *Staphylococcus aureus*, vč. jejich vlastností i onemocnění, která způsobují nebo na jejichž vzniku se podílejí.
3. Z publikovaných odborných textů vypracujte rešerši k možnostem detekce vybraných toxinů, a to metodami imunochemickými, analytickými, molekulárně-biologickými, aj.
4. Bakalářskou práci zpracujte v souladu se Směrnicí č. 9/2012 Univerzity Pardubice a dále ve znění Dodatku č. 1 ke Směrnicí č. 9/2012 "Pravidla pro zveřejňování závěrečných prací a jejich základní jednotnou formální úpravu".

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**
Seznam odborné literatury:

Vedoucí bakalářské práce: **Ing. David Šilha, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce: **21. prosince 2018**
Termín odevzdání bakalářské práce: **4. července 2019**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.
vedoucí katedry

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 se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající 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.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 14. 6. 2019

Ivana Řičičářová

PODĚKOVÁNÍ

Touto cestou bych ráda poděkovala vedoucímu mé bakalářské práce Ing. Davidu Šilhovi Ph.D. za velice cenné rady a odborné vedení. Velké poděkování patří samozřejmě také mé rodině, která mi byla po celou dobu studia oporou, jak po finanční, tak i psychické stránce.

ANOTACE

Tato bakalářská práce zahrnuje ve své první části charakteristiky dobře známé patogenní bakterie *Staphylococcus aureus*. Dále se zabývá toxiny, které stojí za patogenitou uvedené bakterie a jsou příčinou mnoha infekčních onemocnění. Text práce je zaměřen na metody detekce těchto nebezpečných toxinů.

KLÍČOVÁ SLOVA

Staphylococcus aureus, výskyt, toxiny, metody detekce

TITLE

Methods for detection toxins producing by bacteria *Staphylococcus aureus*

ANNOTATION

The first part of this thesis includes characteristics of well-known pathogen *Staphylococcus aureus*. Following part is about toxins, which is the main reason of pathogenity and it causes lot of illnesses. The text is focused on methods of detection those dangerous toxins.

KEYWORDS

Staphylococcus aureus, occurence, toxins, methods of detection

OBSAH

0	ÚVOD.....	12
1	<i>Staphylococcus aureus</i>	13
1.1	Charakteristika a kultivace.....	14
1.2	Antigenní stavba	16
1.3	Genom.....	16
1.4	Patogenita.....	17
1.5	Laboratorní identifikace.....	18
2	Faktory virulence	20
2.1	Povrchové faktory virulence	20
2.2	Extracelulární faktory virulence	20
2.2.1	Enzymy	22
3	Toxiny bakterie <i>Staphylococcus aureus</i>	23
3.1	Toxiny tvořící póry	23
3.2	Exfoliativní toxiny	28
3.3	Superantigeny	29
4	Metody detekce toxinů bakterie <i>Staphylococcus aureus</i>	31
4.1	Přímé metody detekce stafylokokových enterotoxinů.....	31
4.1.1	Imunologické metody	31
4.1.2	Fyzikálně-chemické metody.....	36
4.2	Nepřímé metody detekce stafylokokových enterotoxinů	40
4.2.1	Molekulárně biologické metody.....	40
5	POUŽITÁ LITERATURA	43

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 – Grampozitivní <i>Staphylococcus aureus</i> – barvení dle Grama.....	15
Obrázek 2 – <i>Staphylococcus aureus</i> při zvětšení 10 000× elektronovým mikroskopem.....	15
Obrázek 3 – Syndrom opařené kůže u dvouletého dítěte	18
Obrázek 4 – Syndrom opařené kůže stejného dítěte po 7-denní terapii antibiotiky	18
Obrázek 5 – <i>Staphylococcus aureus</i> na Baird-Parker agaru.....	19
Obrázek 6 – <i>Staphylococcus aureus</i> na krevním agaru	19
Obrázek 7 – Buňka <i>Staphylococcus aureus</i> – faktory virulence a složky buněčné stěny	21
Obrázek 8 – Stafylokokový <i>alfa</i> -toxin – pohled zepředu.....	24
Obrázek 9 – Stafylokokový <i>alfa</i> -toxin – pohled z boku	24
Obrázek 10 – CAMP test.....	25
Obrázek 11 – Znázornění 3D struktury enterotoxinů <i>S. aureus</i>	30
Obrázek 12 – Klasická 96-jamková destička pro metodu ELISA	33
Obrázek 13 – Identifikace stafylokokového enterotoxinu A pomocí western blottingu.....	35
Obrázek 14 – Standardní provedení PCR a potřebná činidla	41

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

ADAM10	Specifický receptor pro <i>alfa</i> -toxin
CAMP test	Test sloužící k odlišení <i>beta</i> -hemolytických streptokoků
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
dsDNA	<i>z angl.</i> Double-strand DNA – dvouvláknová DNA
EIA	<i>z angl.</i> Enzyme immuno assay – enzymová imunoanalýza
ELFA	<i>z angl.</i> Enzyme linked fluorescent assay – enzymatický fluorescenční imunotest
ELISA	<i>z angl.</i> Enzyme linked immunosorbent assay – imunologická metoda sloužící pro detekci a stanovení koncentrace antigenů a protilátek
ETA	Exfoliativní toxin typu A
ETB	Exfoliativní toxin typu B
ETC	Exfoliativní toxin typu C
ETD	Exfoliativní toxin typu D
Fc fragment	Část molekuly imunoglobulinu, díky které se protilátka naváže na buňku
<i>mecA</i>	Gen zodpovědný za rezistenci u kmene MRSA
HglA, HglB, HglC	Proteiny tvořící součást <i>gama</i> -hemolyzinu
HPLC	<i>z angl.</i> High performance liquid chromatography – vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IFN- γ	Interferon gama patří do skupiny cytokinů
IgY	Kuřecí imunoglobulin

IL-2	Protizánětlivé interleukiny produkované T-lymfocyty
iqPCR	Imunokvantitativní real-time PCR
LC-MS	<i>z angl.</i> Liquid chromatography mass spectrophotometry – kapalinová chromatografie s hmotnostním spektrofotometrem
LC-MS-ESI	Kapalinová chromatografie spojená s hmotnostním spektrofotometrem a elektrosprejovým ionizačním zdrojem
LFD	<i>z angl.</i> Lateral flow device – imunochromatografická metoda
LukAB	Leukotoxin
LukED	Leukotoxin
LukS-PV	Protein, ze kterého se skládá Pantonův-Valentinův leukocidin
LukF-PV	Protein, ze kterého se skládá Pantonův-Valentinův leukocidin
MALDI-TOF-MS	<i>z angl.</i> Matrix assisted laser desorption ionization time of light – hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí a ionizací za účasti matrice
MCH II	Třída molekul hlavního histokompatibilního komplexu
MRSA	Methicilin rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>
PAGE	Diskontinuální elektroforéza v polyakrylamidovém gelu
PCR	<i>z angl.</i> Polymerase chain reaction – polymerázová řetězová reakce
PFT	Toxiny tvořící póry
PFR2	Receptor schopný interakce s moduliny rozpustnými ve fenolu tím dochází k aktivaci neutrofilů
PSM	Moduliny rozpustné ve fenolu
PVL	Pantonův-Valentinův leukocidin

qRT-iPCR	<i>z angl.</i> Quantitative real-time immuno-PCR – kvantitativní imuno-PCR v reálném čase
RPLA	<i>z angl.</i> Reversed passive latex agglutination – reverzní pasivní latexová aglutinace
RIA	<i>z angl.</i> Radioimmunoassay – radioimunoanalýza
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SDS-PAGE	<i>z angl.</i> Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis – dodecyl sulfát-elektroforéza v polyakrylamidovém gelu
TNF	tzv. tumor nekrotizující faktor patřící do skupiny cytokinů
TSST-1	Toxin syndromu toxického šoku
SE	Stafylokokové enterotoxiny
SAgs	Superantigeny <i>S. aureus</i>
SEA	Stafylokokový enterotoxin A
SEB	Stafylokokový enterotoxin B
SEC	Stafylokokový enterotoxin C
SED	Stafylokokový enterotoxin D
SEE	Stafylokokový enterotoxin E
SEG	Stafylokokový enterotoxin G
SEH	Stafylokokový enterotoxin H
RNAIII	Malá ribonukleová kyselina schopná regulovat genovou expresi některých genů <i>S. aureus</i>

0 ÚVOD

Mikroorganismy jsou nejpočetnějšími organismy na Zemi. Na naší cestě životem nás provázejí ihned od zrození až do úplného konce. Nepředstavitelné množství těchto buněk osidluje naše tělo, ale úplně nejvíce se jich nachází ve střevech, kde jsou však nezbytnou součástí naší přirozené mikroflóry a hrají nezastupitelnou roli při trávení potravy. Někdy se však tato symbióza může narušit, a i původně prospěšné bakterie mohou začít člověku škodit.

Zástupci rodu *Staphylococcus* patří mezi nejrozšířenější, nejobávanější a také nejdůležitější patogeny vůbec. Nejvýznamnějším zástupcem tohoto rodu je bezesporu *Staphylococcus aureus*, který osidluje kůži a také respirační trakt, přičemž u některých jedinců nemusí vyvolávat žádné projevy, či problémy. V některých případech mohou infekce nabývat rozměrů od mírných infekcí kůže až po těžké nekrotizující pneumonie a život ohrožující sepse.

Četnost těchto infekcí se zvyšuje a léčba je stále obtížnější, a to i z důvodu vzniku rezistence na široké spektrum antimikrobiálních látek mezi nimiž je u *S. aureus* nejčastější methicilinová rezistence. Infekční schopnost *S. aureus* a její následky jsou spojeny s výskytem faktorů virulence mezi nimiž mají velký vliv toxiny produkované touto bakterií. Toxinům je přičítáno, že způsobují některá onemocnění jako je syndrom toxického šoku nebo hluboké infekce mezi nimiž jsou i nekrotizující pneumonie.

Tato bakalářská práce se zaměřuje na rod *Staphylococcus* a jeho významný druh *Staphylococcus aureus*, popisuje faktory virulence zahrnující toxiny a jimi způsobená onemocnění. Hlavní podstatou práce jsou metody věnující se detekci toxinů tohoto obávaného patogenu. Pro stanovení je v současné době na výběr množství technologií a metod, jimiž je možné provést identifikaci jednotlivých toxinů. Metody jsou založeny především na principech imunologických, fyzikálně-chemických a molekulárně-biologických.

1 *Staphylococcus aureus*

Alexander Ogston v roce 1880 jako první pozoroval bakterii *S. aureus* v mikroskopickém preparátu, který byl zhotoven z hnisu otevřeného poranění (Lowy, 1998). O čtyři roky později v roce 1884 byla bakterie *S. aureus* pojmenována Antonem Rosenbachem, německým chirurgem. Rosenbach izoloval dva kmeny stafylokoků a to *S. aureus* a *S. epidermidis*, následně je určil na základě pigmentu kolonií (Rosenbach, 1884). V této době byla většina infekcí způsobených bakterií *S. aureus* smrtelná a při vzniku bakteremie se jednalo o úmrtnost až 82 % (Skinner a kol., 1941). Tato míra úmrtnosti se značně snížila po zavedení penicilinu do klinické praxe (Ladhani, 2005).

Na počátku čtyřicátých let se však objevily první kmeny *S. aureus* rezistentní na penicillin a do deseti let bylo téměř 25 % kmenů, rezistentních na toto antibiotikum (Rammelkamp a kol., 1942). *S. aureus* je rezistentní na penicilin, díky plazmidu, který kóduje schopnost tvořit penicilinázu, tedy *beta*-laktamázu specificky štěpící molekulu penicilinu (Votava a kol., 2003). Na překonání problému rezistence byly v šedesátých letech vyvinuta antibiotika methicilin a oxacilin, avšak pouhý jeden rok stačil ke znovuobjevení rezistentních kmenů, které začaly být označovány jako MRSA (Jevons, 1961).

Dnes jsou mezi hospitalizovanými pacienty, nejčastěji náchylnými k získání těchto infekcí, hlavně jedinci s oslabeným imunitním systémem a také se v některých případech můžeme setkat s nákazou po použití kontaminovaných zařízení, jako jsou ventilátory nebo katétry (Chatterjee a kol., 2013).

Druh *Staphylococcus aureus* zahrnuje dva poddruhy, a to *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* a *Staphylococcus aureus* subsp. *anaerobius*. Druhý poddruh je anaerobní na rozdíl od většiny fakultativně anaerobních druhů tohoto rodu. *S. aureus* subsp. *anaerobius* se u člověka vyskytuje zřídka a nejčastěji způsobuje chronické onemocnění koz a ovcí, které se projevuje tvorbou nekrotických lézí na povrchu uzlin (De la Fuente a kol., 2011). Tento text se bude týkat pouze poddruhu *S. aureus* subsp. *aureus* o kterém budeme hovořit jako o *S. aureus*.

Staphylococcus aureus je nebezpečný patogen, který způsobuje řadu různých onemocnění. Nejvíce frekventované jsou kožní infekce a infekce respiračního traktu. Kožní infekce jsou nejčastěji získané v komunitě, zatímco infekce respiračního ústrojí mají převážně

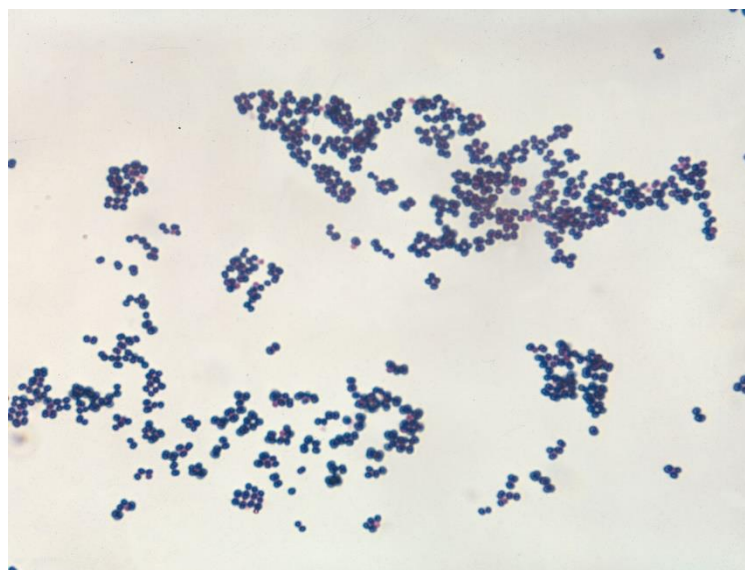
nosokomiální původ. *Staphylococcus aureus* je mezi patogeny přenášenými nosokomiální cestou spojován s největší morbiditou a mortalitou (Francis a kol., 2005). Přibližně u třetiny lidí žije *S. aureus* na kůži nebo sliznicích a nevyvolává žádné potíže. Jakmile se však projeví porucha odolnosti nebo dojde k oslabení imunity jedince, může docházet k průniku do tkání a vyvolání onemocnění sahajícího od banálních kožních infekcí až po život ohrožující záněty a smrtelné sepse (Votava a kol., 2003).

1.1 Charakteristika a kultivace

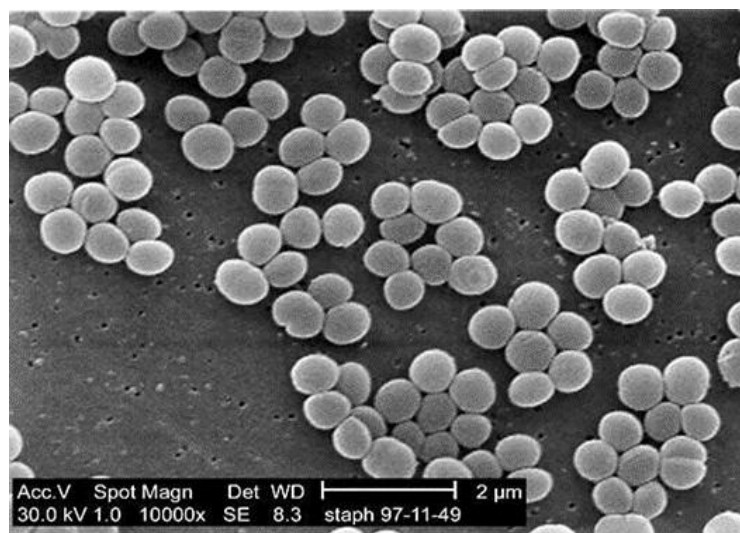
Obrázek 2). Tyto koky se vyskytují obvykle v hroznovitých útvarech a jsou to mikroorganismy nesporulující (*Obrázek 1*). Rostou na různých typech agarů optimálně po dobu 24 hodin při 37 °C. Mohou však růst v rozmezí od 7 °C do 48,5 °C (Schmitt a kol., 1990). Jednotlivé kolonie jsou kulovité a mají v průměru asi 2-3 mm, zároveň mají hladký vzhled a lesklý povrch. Kolonie se jeví jako neprůhledné a některé mají charakteristicky zlato-žlutou barvu (Greenwood a kol., 2012). Rozsah pH, který je možný pro přežití bakterií se pohybuje mezi 4,5 až 9,3 a optimálně mezi 7 až 7,5 (Labbé a kol., 2013). *S. aureus* je relativně podobný ostatním méně virulentním stafylokokům a vzhledem k této podobnosti se rozlišuje pomocí diagnostických testů. Jedním z charakteristických znaků, který tento patogen vykazuje je *beta*-hemolýza na krevním agaru (Wilkinson, 1997).

Staphylococcus aureus má respirační metabolismus a roste nejlépe za aerobních podmínek. Může však využívat také fermentační metabolismus, což způsobuje jeho fakultativně anaerobní chování. Je také kataláza pozitivní a využívá širokou škálu sacharidů (Labbé a kol., 2013).

Mezi hlavní rozlišovací znaky bakterie *S. aureus* patří produkce extracelulárních enzymů, dále koagulázy, která přeměňuje plazmatický fibrinogen na nerozpustný fibrin, což je podporováno aktivátorem v plazmě. Termostabilní nukleáza a vázaná koaguláza patří mezi další znaky *S. aureus*. Dnes je již k dispozici řada komerčně dodávaných systémů, které umožňují identifikaci velkého počtu druhů mikroorganismů (Greenwood a kol., 2012).



Obrázek 1 - Grampozitivní *Staphylococcus aureus* – barvení dle Grama (www.britannica.com)



Obrázek 2 - *Staphylococcus aureus* při zvětšení 10 000× elektronovým mikroskopem (www.britannica.com)

1.2 Antigenní stavba

Kostrou buněčné stěny stafylokoků je peptidoglykan, který má důležitou roli v patogenezi onemocnění a je také základní komponentou buněčné stěny všech grampozitivních bakterií (Horáček a kol., 2000). Peptidoglykan je hlavní složkou stafylokokové buněčné stěny (50 %) a skládá se ze dvou střídajících se polysacharidových podjednotek N-acetylglukosaminu a kyseliny N-acetylmuramové s β -1,4-glykosidickými vazbami (Lowy, 1998). Dále je tato stěna kromě peptidoglykanu tvořena kyselinou teichoovou a proteinem A. Stafylokokový peptidoglykan (murein) podněcuje uvolňování cytokinů z makrofágů, aktivaci komplementu a shlukování krevních destiček (Votava a kol., 2003). Kyselina teichoová navozuje tvorbu protilátek a protein A je schopný se vázat na Fc fragment IgG (Horáček a kol., 2000). Společně tyto dvě komponenty buněčné stěny představují 90 % hmotnosti buněk (Harris, 2002).

V buněčné stěně také dále nalezneme adheziny, které zodpovídají za adhezi stafylokoků na mezibuněčné nebo buněčné struktury hostitele jako fibronektin, kolagen, fibrinogen, aj. (Horáček a kol., 2000) nebo k povrchu hostitelských buněk. Adheziny představují iniciační faktory virulence, které se uplatňují při průniku stafylokoků do porušené tkáně a další invazi do okolí (Bednář a kol., 1996).

1.3 Genom

Genom *S. aureus* se skládá z jednoho kružnicového chromozomu o velikosti zhruba 2,8 Mbp a z variabilních genetických elementů, mezi které patří profágy, plazmidy, transpozony a další (Baba a kol., 2008).

Pro *S. aureus* je typické, že přenos genů mezi kmeny se děje pomocí transdukce a uplatňují se zde temperované bakteriofágy. Tento proces probíhá také při přenosu genů rezistence na antibiotika, které jsou umístěny na plazmidech (Votava a kol., 2003).

Za posledních deset let se zvýšily poznatky o populaci *S. aureus* a jejich vývoji kvůli technologickému pokroku, a to zejména díky celogenomovému sekvenování, molekulární typizaci a srovnávací genomové hybridizaci.

Mobilní genetické elementy jsou části DNA, které kódují faktory v genomu a ty jim umožňují se přemisťovat v rámci genomu nebo mezi jednotlivými genomy. Hlavními

mobilními genetickými elementy u *S. aureus* jsou bakteriofágy, ostrovy patogenity, plazmidy, transpozomy a stafylokokové chromozomové kazety. Většina těchto elementů často podléhá horizontálnímu přenosu a rekombinaci (Lindsay a kol., 2010).

Bakteriofágy jsou schopny kódovat toxiny jako jsou enterotoxin A, Pantonův-Valentinův leukocidin a další. Ostrovy patogenity jsou schopny kódovat toxin způsobující syndrom toxického šoku a geny superantigenů. Velké plazmidy mohou nést kombinaci genů rezistence včetně penicilinázy, těžkých kovů a aminoglykosidů. Mnoho kmenů *S. aureus* nese jeden nebo více plazmidů (Lindsay a kol., 2010).

1.4 Patogenita

Staphylococcus aureus je jedním z nebezpečných nozokomiálních patogenů, které způsobují pooperační infekce a závažná onemocnění jako je absces, endokarditida a toxické syndromy u lidí i zvířat. Pro udržení kontroly nad tímto patogenem se již po několik let široce využívají antibiotika, ale zároveň se také objevují kmeny rezistentní vůči antibiotikům jako je methicillin rezistentní *S. aureus* (Chang a kol., 2013).

S. aureus se vyskytuje v dutině nosní asi u 30 % zdravé populace lidí a můžeme ho nalézt také na kůži. Infekci způsobuje nejčastěji v místech snížené odolnosti hostitele, jako je poškozená kůže a sliznice (Greenwood a kol., 2012). Jakmile *S. aureus* ulpí na hostitelských tkáních může růst, přetrvávat a vyhýbat se imunitnímu systému různými způsoby. Jedním ze způsobů je tvorba biofilmu na hostitelských povrchích, které této bakterii umožňují překonávat obranné reakce hostitele i účinek některých antimikrobiálních látek. Schopnost tvořit a vyskytovat se v biofilmech je jedním z důvodů proč lze některé infekce vymýtit jen velice obtížně. *S. aureus* může také přežívat v epiteliálních buňkách *in vitro*, aby unikl obraně hostitele. Dále je schopen tvořit malé koloniální varianty, které mohou přispívat k opakující se nebo setrvávající infekci (Gordon, 2008).

Během množení bakterií při infekci *S. aureus* produkuje množství toxinů např. hemolytické toxiny, leukocidin, toxin syndromu toxického šoku aj. *S. aureus* může vyvolat septický šok, k čemuž dojde aktivací a interakcí imunitního systému hostitele s koagulačními cestami. Kromě septického šoku jsou některé kmeny tohoto stafylokoka

schopny produkovat superantigeny, což vede k různým toxickým otravám, jako je alimentární otrava a syndrom toxického šoku. Některé kmeny produkují také epidermolysin nebo exfoliativní toxiny, které mohou vést k syndromu opařené kůže nebo bulóznímu impetigu (Obrázek 3, 4) (Gordon, 2008).



Obrázek 3 - Syndrom opařené kůže u dvouletého dítěte (Ladhani, 2001)



Obrázek 4 - Syndrom opařené kůže stejného dítěte po 7-denní terapii antibiotiky (Ladhani, 2001)

1.5 Laboratorní identifikace

Mikroskopické určování morfologie umožní rozlišit bacily, streptokoky a kvasinky od stafylokoků, které tvoří nepravidelné shluky koků či hroznovité útvary. Dále může být použit test na katalázu, který je pozitivní (Labbé a kol., 2013).

Pro identifikaci *S. aureus* může být použito mnoho různých testů, včetně testu produkce proteinu A, tepelně stabilní nukleázy a vázané koagulázy, dále byly pro identifikaci vyvinuty i molekulární metody. Kontrola kvality testů by měla být prováděna s využitím pozitivních a negativních kontrolních kmenů či komerčních systémů (Brown a kol., 2005).

Standardními metodami se testuje antimikrobiální citlivost pomocí cefoxitinu pro potvrzení kmenů MRSA. Komerčně dostupné molekulární metody využívají polymerázovou řetězovou reakci, která má schopnost zkrátit dobu identifikace kmenů MRSA ze 42 hodin na 12 hodin za účelem dřívějších preventivních opatření (Greenwood a kol., 2012). Latexové metody detekující protein 2a vázající penicilin nebo metody polymerázové řetězové reakce

detekující gen *mecA* mohou být použity pro potvrzení nejednoznačných výsledků (Brown a kol., 2005).

Staphylococcus aureus se laboratorně odlišuje od ostatních druhů stafylokoků především jejich sledováním na živných půdách, kde se využívá kombinace hodnocení morfologie kolonií a produkovaného pigmentu. Sledujeme také zda produkuje koagulázu, termonukleázu, *beta*-galaktosidázu, fosfatázu a *alfa*-toxin. *S. aureus* štěpí mannitol, maltózu, xylózu, trehalosu, sacharózu a je rezistentní na novobiocin.

Živná půda používaná pro identifikaci tohoto druhu je například Baird-Parker agar (Obrázek 5), chromogenní médium či krevní agar (Obrázek 6) (Labbé a kol., 2013).



Obrázek 5 - *Staphylococcus aureus* na Baird-Parker agaru (www.fishersci.ca)



Obrázek 6 - *Staphylococcus aureus* na krevním agaru (www.tcd.ie)

2 Faktory virulence

Pozoruhodným rysem u stafylokoků je, že jeden faktor virulence může mít v patogenezi několik funkcí a více faktorů virulence může zastávat stejnou funkci (Gordon, 2008). Buňky *S. aureus* jsou vybaveny tzv. faktory virulence, které mohou být povrchové a extracelulární, z nichž některé přispívají ke schopnosti mikroorganismu překonat obranyschopnost jedince, napadnout a kolonizovat tkáň. Přestože role jednotlivých faktorů virulence není zcela pochopena individuálně je velmi pravděpodobné, že jsou odpovědné za vznik infekce. (Greenwood, 2012).

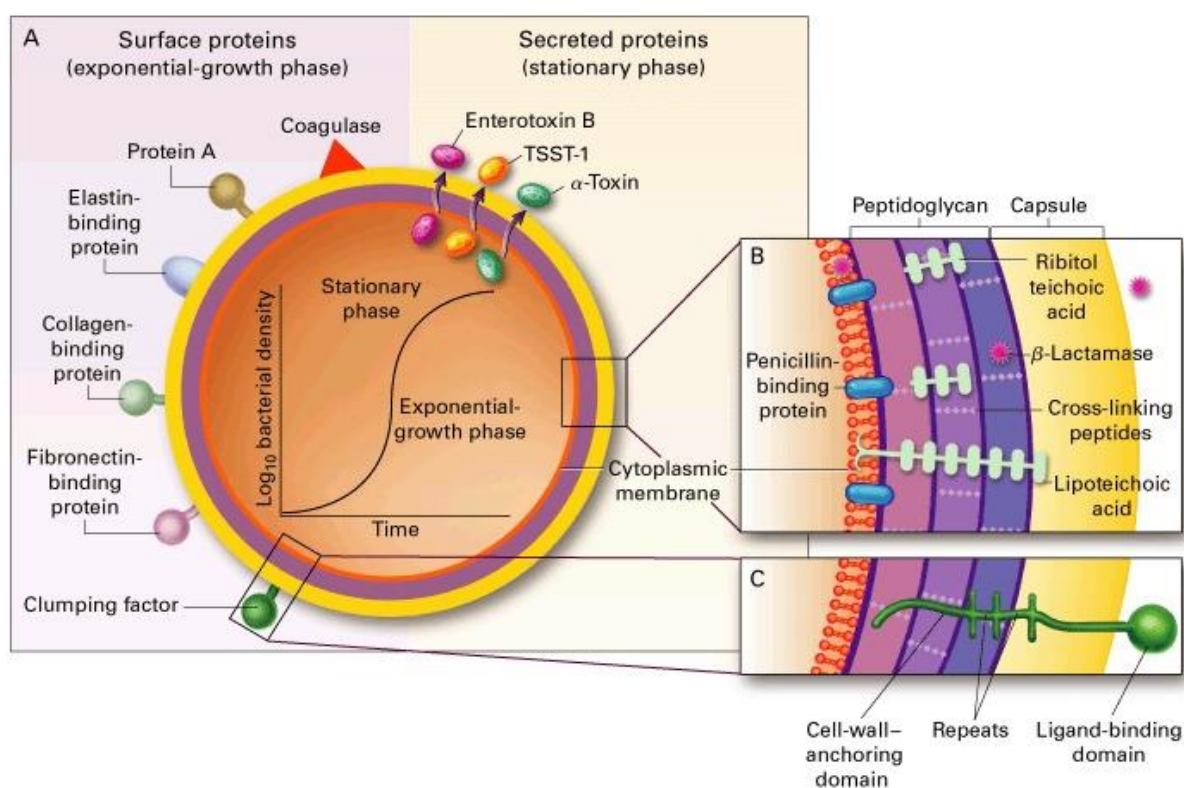
2.1 Povrchové faktory virulence

Mezi povrchové faktory virulence se řadí peptidoglykan, protein A a tvorba pouzdra. Do povrchových antigenů řadíme také vázanou koagulázu, která je přítomna na vnějším povrchu buňky většiny kmenů *S. aureus* a váže se na fibrinogen, který následně přetváří na fibrin (Horáček a kol., 2000). Další povrchové proteiny se vážou např. na kolagen, elastin nebo fibronectin a díky těmto povrchovým faktorům může stafylokok adherovat na hostitelskou tkáň (Votava a kol., 2003).

2.2 Extracelulární faktory virulence

Téměř všechny kmeny *S. aureus* vylučují skupiny extracelulárních faktorů jako jsou enzymy (exoproteiny) a toxiny (exotoxiny). Mezi enzymy patří nukleázy, proteázy, lipázy, hyaluronidázy a kolagenázy. Jejich schopnost produkovat *beta*-laktamázy (penicilinázy) poskytuje stafylokokům ochranu proti antimikrobiálním léčivům.

Mezi toxiny řadíme *alfa*-toxin, *beta*-toxin, *gamma*-toxin, a Pantonův-Valentinův leukocidin (Miljkovic-Selimovic a kol., 2015). Dále mezi typické toxiny způsobující infekční onemocnění patří TSST-1, což je toxin syndromu toxického šoku, enterotoxiny a exfoliativní toxiny (Obrázek 7) (Bukowski a kol., 2010). Stafylokové enterotoxiny (SE) zahrnují podtřídy A, B, C, D, E, G a H (Dinges a kol., 2000) a u exfoliativních enzymů (ET) existují dva různé sérotypy ovlivňující člověka (A a B). ETA se vyskytuje častěji u kmenů izolovaných v Evropě, Africe a Severní Americe asi z 80 %, zatímco v Japonsku je běžnější ETB (Ladhami, 2001).



Obrázek 7 - Buňka *Staphylococcus aureus* – faktory virulence a složky buněčné stěny (Gordon a kol., 2008)

2.2.1 Enzymy

K enzymům *S. aureus* můžeme řadit katalázu, koagulázu, hyaluronidázu, nukleázu, lipázu, fibrinolysin a penicilinázu (Votava a kol., 2003). Kataláza inaktivuje toxický peroxid vodíku a volné radikály. Katalázu lze považovat za faktor virulence, neboť jeho aktivita v bakteriálních buňkách chrání fagocytující mikroby před účinky peroxidu vodíku, který je produkovaný fagocytovanými buňkami (Miljković-Selimović a kol., 2015).

S. aureus produkuje dva typy koagulázy, stafylokoagulázu a von Willebrandův faktor, které přispívají ke tvorbě krevních sraženin. Vznik sraženiny probíhá tak, že se Stafylokoaguláza naváže na protrombin a vznikne komplex zvaný stafylothrombin, ten poté katalyzuje proces konverze fibrinogenu na fibrin. Tímto způsobem dochází ke vzniku fibrinových sraženin na povrchu buněk *S. aureus*, což inhibuje fagocytózu a způsobuje tvorbu abscesů (Otto, 2014). Fibrinolysin je enzym, který štěpí fibrin a tím usnadňuje šíření infekce do okolní tkáně (Otto, 2014).

Hyaluronidáza je bakteriální enzym, který štěpí β -1,4-glykosidickou vazbu kyseliny hyaluronové. U řady gram-pozitivních organismů bylo prokázáno, že hyaluronidázy jsou základními faktory virulence, protože jsou schopny šířit buňky a faktory virulence prostřednictvím tkáně. Kyselina hyaluronová se vylučuje z plazmatické membrány savčích buněk a je hojná v kůži, kosterní tkáni, pupeční šňůře v plicích atd. Mnoho z těchto tkání s vysokými koncentracemi kyseliny hyaluronové může být často infikováno bakterií *S. aureus*. (Ibberson, 2014).

Beta-laktamáza nebo také penicilináza je enzym inaktivující peniciliny a cefalosporiny otevřením *beta*-laktamového kruhu. *Beta*-laktamázy mohou být distribuovány Gram-pozitivními i Gram-negativními bakteriemi (Novick a kol., 1979).

S. aureus produkuje také nukleázy a lipázy jejichž funkce v patogenezi není zcela pochopena. Jednou z možností je, že nukleázy mohou snížit antibakteriální aktivitu neutrofilních extracelulárních pastí, které se skládají z DNA uvolněné z neutrofilů, které podlely lýze (Otto, 2014).

3 Toxiny bakterie *Staphylococcus aureus*

Toxiny *S. aureus* můžeme rozdělit do 3 hlavních skupin – toxiny tvořící póry (PFT), exfoliativní toxiny (ET) a superantigeny (SAGs). Toxiny tvořící póry mohou být dále rozděleny na další čtyři typy – *alfa*-toxin, *beta*-toxin, leukocidin a moduliny rozpustné ve fenolu (Oliveira a kol., 2018). Toxiny poškozující membránu způsobují tvorbu pórů v membráně, což vede k odvodu důležitých molekul a metabolitů. Tyto enzymy jsou tzv. cytolytické. Cytolytické toxiny jsou neslavně proslulé svou schopností lyzovat červené či bílé krvinky. Toxiny, které lyzují červené krvinky se nazývají hemolyziny, a ty které se zaměřují na bílé krvinky zase leukotoxiny. Pro lytickou funkci vyžaduje *S. aureus* interakci s nějakým receptorem (Otto, 2014).

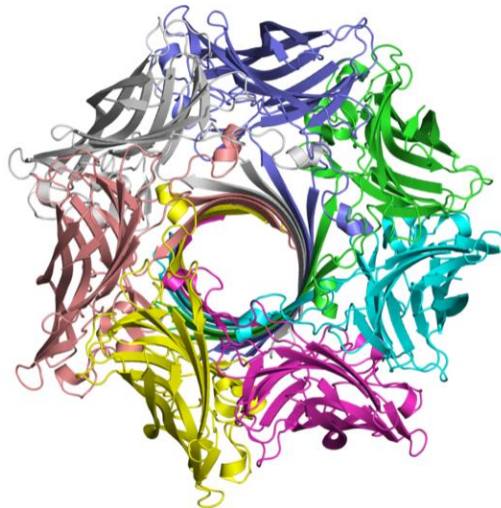
3.1 Toxiny tvořící póry

3.1.1 *Alfa*-toxin (*Alfa*-hemolyzin)

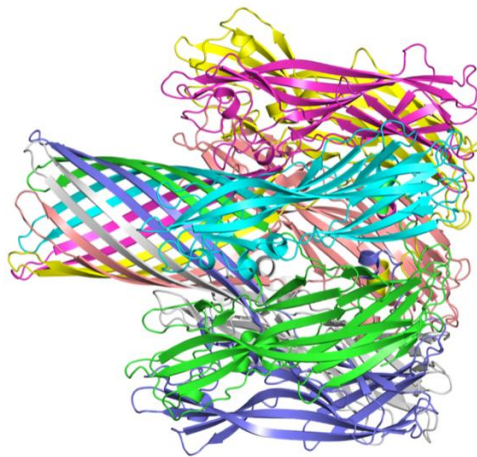
Toxin poškozující membránu jako je *alfa*-toxin se váže na specifické receptory na kterých dochází k tvorbě póru (Otto, 2014). *Alfa*-toxin vytváří takzvaný *beta*-barel, který se skládá z *beta*-listů (Obrázek 8Obrázek 9). Je pravděpodobně nejznámějším toxinem *S. aureus* a skládá se z 293 aminokyselin. *Alfa*-toxin je polypeptid který je vylučovaný asi 95 % klinických kmenů *S. aureus*. Zmiňovaný toxin se během patogeneze onemocnění váže na svůj specifický receptor ADAM10, který se nachází na membráně hostitelské buňky. Toxin sám o sobě není považován za toxický, ale vazba na tento receptor ho činí nebezpečným. Po vazbě na transmembránový protein ADAM10 se toxin oligomerizuje na heptamer na plazmatické membráně a vytváří se pór. Na konci procesu dochází k tvorbě transmembránového kanálu (Oliveira a kol., 2018). Objev tohoto specifického receptoru byl jedním z klíčových objevů při pochopení role *alfa*-toxinu (Berube, 2013).

Toxické účinky *alfa*-toxinu jsou způsobeny nejen usmrcením citlivých míst, ale také přítomností sekundárních buněčných reakcí, které mohou být spouštěny díky přísunu vápenatých iontů prostřednictvím pórů. Sekundární buněčné reakce zahrnují stimulaci tvorby

kyseliny arachidonové, spuštění exocytózy granul a také kontraktilní dysfunkce. Tyto procesy způsobují těžké dlouhodobé poruchy jako je např. rozvoj plicního edému (Bhakdi a kol., 1991).



Obrázek 8 - Stafylokokový alfa-toxin – pohled zepředu (www.ebi.ac.uk)



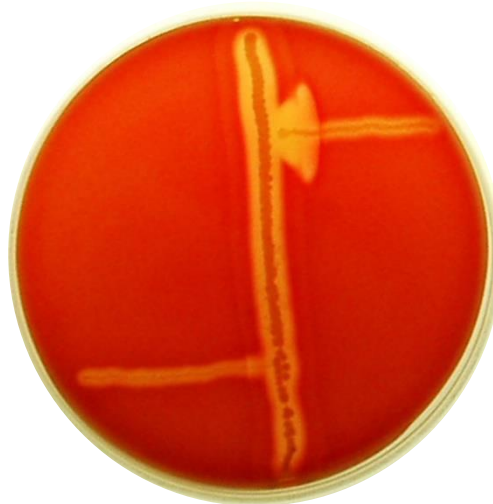
Obrázek 9 - Stafylokokový alfa-toxin – pohled z boku (www.ebi.ac.uk)

3.1.2 *Beta*-toxin (Sfingomyelináza C)

Beta-toxin je neutrální sfingomyelináza a jeho činnost je závislá na teplotě (Miljkovic-Selimovic a kol., 2015). *Beta*-toxin byl poprvé identifikován v roce 1935 firmou Glenny a Stevens, ta také prokázala, že je vysoce hemolytický pro ovčí erythrocyty, ale nikoliv pro králíčí. Zjistili také, že hemolytická aktivita tohoto toxinu je podpořena změnou kultivační teploty z teploty pod 10 °C zvýšením na 37 °C, což také vedlo k tomu, že je nazývaný jako „hot-cold“ hemolysin (Dinges a kol., 2000).

Sfingomyelinázy jsou fosforové diesterové hydrolázy, které štěpí sfingomyeliny, což je nejhojnější sfingolipid v eukaryotické membráně. Tento toxin je hojně produkován v kmenech *S. aureus* izolovaných z bovinní mastitidy a chronických infekcí lidské kůže (Oliveira a kol., 2018). Erythrocyty mají rozdílnou citlivost na *beta*-toxin, to může být způsobeno jejich rozdílným obsahem sfingomyelinu.

V diagnostické mikrobiologii se pro průkaz *beta*-toxinu používá CAMP test (Obrázek 10), který se provádí např. kapáním čistého *beta*-toxinu na půdu pro streptokoky skupiny B, u kterých se předpokládá zvýšená hemolytická aktivita na agaru a inkubuje se při 35 °C po dobu 30 minut až několika hodin. V alternativním případě jsou streptokoky skupiny B nanášeny kolmo na naočkovanou zónu bakterie *S. aureus*, tak, aby se této zóny nedotýkaly. Mezi oběma organismy je pozorovaná oblast zvýšené hemolytické aktivity (Dinges a kol., 2000).



Obrázek 10 - CAMP test – svisle naočkovaná kultura *S. aureus* a kolmo na ni zprava – kultura *Str. agalactiae* a zleva – *Str. Pyogenes* (microbeonline.com)

3.1.3 Leukotoxiny

Leukotoxiny tvořící póry se skládají ze dvou proteinových složek, které dohromady tvoří póry *beta*-barelu. Dosud byly izolovány čtyři dvousložkové leukotoxiny z kmenů *S. aureus* spojeného s lidskými infekcemi. Tyto leukotoxiny jsou Pantonův-Valentinův leukocidin, *gama*-toxin, leukotoxin ED a leukotoxin AB/GH. Toxiny tvořící póry se skládají ze dvou různých proteinových složek označovaných jako „S“ a „F“ (Oliveira a kol., 2018). PVL leukocidin se skládá z proteinů LukS-PV a LukF-PV a *gama*-toxin z proteinů HlgA, HlgB a HlgC. Všechny tyto toxiny potřebují pro svou cytolytickou aktivitu interakci s receptorem (Otto, 2014).

Pantonův-Valentinův leukocidin

Pantonův-Valentinův leukocidin je cytotoxin, který způsobuje destrukci erytrocytů a nekrózu tkání. Je tvořen méně než 5 % kmenů *S. aureus* (Lina a kol., 1999). Dále PVL ovlivňuje leukocyty, je spojován s furunkly a kožními abscesy (Oliveira a kol., 2018). Pomocí polymerázové řetězové reakce byly geny PVL detekovány u 85 % kmenů spojených s těžkou nekrotickou hemoragickou pneumonií a u 95 % kmenů způsobujících furunkly (Lina a kol., 1999). Tento leukocidin je také silně asociován s komunitními kmeny MRSA (Oliveira a kol., 2018).

Gama-toxin

Gama-toxin nelze identifikovat na krevních agaroch kvůli inhibičnímu účinku agaru na aktivitu tohoto toxinu (Dinges a kol., 2000). *Gama*-toxin může obsahovat proteiny HlgAB, HlgCB a HlgACB s různými kombinacemi podjednotek. HlgAB a HlgCB sdílejí stejnou podjednotku „F“ (HlgB), ale liší se ve složení „S“ podjednotky (HlgA nebo HlgC). HlgA a HlgC vykazují lytickou aktivitu pouze v kombinaci s HlgB. HlgAB vykazuje cytolytickou aktivitu vůči lidským a králičím leukocytům a je účinný také při lýze lidských červených krvinek. HlgCB má omezenou aktivitu vůči červeným krvinkám. Úloha HlgACB ve virulenci *S. aureus* není příliš známa (Oliveira a kol., 2018).

Leukotoxin ED

LukED byl objeven původně před více než deseti lety. Byla prokázána jeho cytolytická aktivita vůči králíčím, krevním buňkám a leukocytům. Studie dokládají, že tento toxin je jediný, který dokáže s velkou účinností zabíjet fagocyty myši. Geny LukED byly izolovány také u kmenů MRSA (Oliveira a kol., 2018).

Leukotoxin AB

LukAB jinak známý také jako LukGH je nejnovějším toxinem objeveným ve skupině leukotoxinů a jeho úloha během infekce *in vivo* zůstává nejasná. Je jediným leukotoxinem o kterém je známo, že hraje roli při přežití *S. aureus* neboť se podílí na úniku z fagocytů a neutrofilů. Studie leukotoxinu *in vitro* říkají, že LukAB cílí na monocyty, dendritické buňky a leukocyty a má schopnost spolupracovat s PVL leukocidinem (Oliveira a kol., 2018).

3.1.4 Moduliny rozpustné ve fenolu

Moduliny rozpustné ve fenolu (PSM) jsou skupina toxinů, která byla roku 1999 objevena ve filtrátu kultury *Staphylococcus epidermidis* a z tohoto filtrátu byla izolována extrakcí horkým fenolem a popsána jako tzv. „protizánětlivý komplex“. V komplexu byly identifikovány tři peptidy (α , β a γ) a popsány jako tzv. „moduliny rozpustné ve fenolu“ (Peschel a kol., 2013). *S. aureus* produkuje velké množství silně cytolytických modulinů, zejména čtyři PSM α peptidy – PSM α 1, PSM α 2, PSM α 3 a PSM α 4, z nichž PSM α 3 patří mezi nejaktivnější. (Otto, 2014).

Moduliny rozpustné ve fenolu mají mnohočetné role v patogenezi *S. aureus*, způsobují lýzu červených a bílých krvinek, stimulují zánětlivé reakce a přispívají k tvorbě biofilmu a tím i šíření infekcí (Peschel a kol., 2013). PSM α peptidy *S. aureus* byly identifikovány jako toxiny, které přispívají k lýze neutrofilů, poté co je neutrofily pohltí, což je mechanismus nesmírně důležitý pro vysokou toxicitu agresivních kmenů *S. aureus*. K aktivaci neutrofilů dochází díky interakci modulinů rozpustných ve fenolu a receptoru PFR2. Interakcí s tímto receptorem zároveň vyvolávají PSM zánětlivé reakce (Otto, 2014).

V roce 2007 bylo zjištěno, že známý *delta*-toxin patří do skupiny modulinů rozpustných ve fenolu (Otto, 2014). Zmíněný toxin je schopen lyzovat erythrocyty a další savčí buňky, dále také subcelulární struktury jako jsou sféropasty a protoplasty. Byla také pozorována dermonekrotická aktivita a letalita u pokusných zvířat při použití ve vysokých koncentracích. Zůstává však také možnost, že tyto změny jsou způsobeny kontaminací malým množstvím *alfa*-toxinu. Přítomnost fosfolipidů inhibuje aktivitu *delta*-toxinu (Dinges a kol., 2000).

3.2 Exfoliativní toxiny

Exfoliativní toxiny jinak známé také jako epidermolytické toxiny, jsou extrémně specifické serinové proteázy, které vylučuje *S. aureus*. Tyto proteázy rozpoznávají a hydrolyzují kadheriny v povrchových vrstvách kůže (Oliveira a kol., 2018). Dosavadní známé exfoliativní toxiny (ET) jsou A, B, C, D. ETA a ETB nejvíce ovlivňují poškození lidské kůže, zatímco ETC byl izolován pouze z infekce u koně a u člověka prokázán nebyl. ETD byl poprvé identifikován v roce 2002 u klinického kmene *S. aureus*. Tyto toxiny jsou produkovány asi 5 % kmenů *S. aureus*. Výskyt ETA nejvíce převažuje u kmenů *S. aureus* v Evropě a Africe, zatímco ETB je častější v Japonsku (Oliveira a kol., 2018).

Exfoliativní toxiny jsou zodpovědné za stafylokokový syndrom opárené kůže, který postihuje zejména kojence a malé děti. První popis syndromu pochází z roku 1878 od německého lékaře, který pozoroval stav malých dětí v azylovém domě v Československu. Trvalo téměř dalších sto let, než byly objeveny a popsány toxiny způsobující tento syndrom (Ladhani, 2003). Syndrom opárené kůže, též známý jako Ritterova choroba se navenek projevuje exfoliací kůže. Mezi další symptomy může patřit horečka, malátnost a letargie. Po těchto příznacích následuje tvorba velkých, křehkých puchýřů naplněných tekutinou. Puchýře prasknou mechanickým působením, přičemž postižené části těla zůstanou bez ochranné vrstvy epidermis. Lokalizovaná forma onemocnění je nazývána jako bulózní impetigo. Tyto dva typy infekce se liší pouze rozsahem postižení (Bukowski a kol., 2010).

Novorozenci jsou obzvláště citliví na nedostatek kožní bariéry, která může způsobit nadměrné ztráty bílkovin, tekutin, hypotermii a sekundární infekci. Infekce však většinou ustupuje s vhodnou léčbou a mortalita zůstává pod 5 %. Naopak dospělí, u kterých se vyvinula

generalizovaná forma syndromu stafylokokové opařené kůže, mají vždy nějaký primární problém (např. imunodeficience, či selhání ledvin). V tomto případě je mortalita přes 50 % i navzdory léčbě antibiotiky (Ladhani, 2003).

3.3 Superantigeny

Superantigeny byly původně označovány jako stafylokokové enterotoxiny (Obrázek 11), protože způsobují symptomy typické pro alimentární otravu (zvracení a průjem). Současně je popsáno více než 23 toxinů patřících do skupiny superantigenů. Mezi superantigeny řadíme toxin syndromu toxického šoku (TSST-1) a stafylokokové enterotoxiny A až E, G až J, L až Q a R až T a 11 stafylokokových superantigenních toxinů (SEIK až SEIQ, SEIU až SEIX) (Oliveira a kol., 2018).

Jak již bylo řečeno stafylokokový enterotoxin A je nejběžnějším toxinem podílejícím se na alimentárních otravách (Balaban, 2000). Stafylokokový enterotoxin B je také považován za biologickou zbraň. Dále bylo prokázáno, že enterotoxin C podporuje infekční endokarditidu, sepsi a poškození ledvin (Otto, 2014). SED je druhým nejčastějším sérotypem spojeným s alimentárními otravami (Balaban, 2000).

Stafylokoková alimentární otrava je charakterizována krátkou inkubační dobou (2 až 6 hodin), následuje nevolnost, zvracení, bolest břicha a průjem. Stafylokokový enterotoxin A je nejběžnějším enterotoxinem způsobujícím alimentární otravy v USA, následovaný SED a SEB. Akutní stafylokoková enterotoxikóza může ve vzácných případech způsobit smrt jedince, otrava nemusí být vždy fatální, ale starší osoby jsou náchylnější k mortalitě (Balaban, 2000).

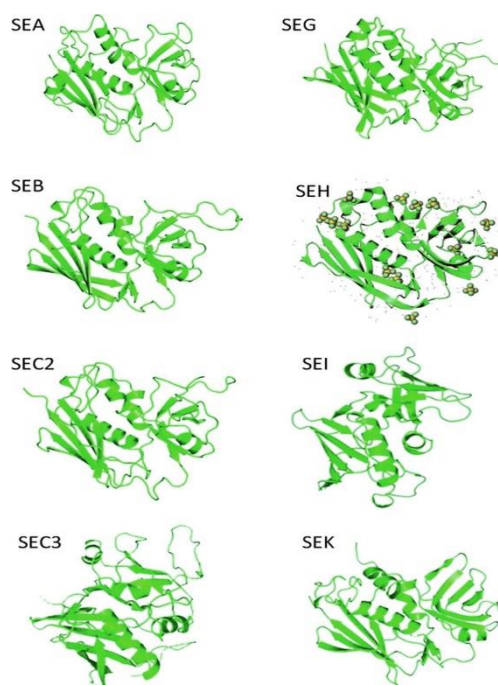
Superantigeny jsou proteiny vykazující letální aktivitu, pyrogenicitu, některé z nich mají emetickou aktivitu a schopnost pronikat přes slizniční bariéry. Každý z těchto toxinů má silný vliv na buňky imunitního systému a také mohou mít některé další biologické účinky (Dinges a kol., 2000). Všechny mají společnou vysokou stimulační aktivitu pro T-lymfocyty, makrofágy, žírné buňky, eosinofily a epitelové buňky (Bachert a kol., 2002).

Superantigeny jsou molekuly, které spouštějí aktivaci a proliferaci T-lymfocytů bez nutnosti zpracování antigenu tím, že umožňují nescifickou interakci hlavního

histokompatibilního komplexu MCH II s receptory T-lymfocytů (Otto, 2014). Molekuly MCH II ovlivňují schopnost makrofágů regulovat odpověď T-lymfocytů na superantigeny. Uvolněné superantigeny působí na T-lymfocyty a ty pak produkují velké množství protizánětlivých cytokinů například IL-2, TNF, IFN- γ , čímž způsobují projevy symptomů jako je vysoká horečka, zvracení, průjem, hypotenze aj. (Oliveira a kol., 2018).

Nejznámější superantigen TSST-1 způsobuje stimulaci uvolňování IL-1 (interleukin 1), IL-2 (interleukin 2), TNF (nekrotický faktor) a dalších cytokinů (Otto, 2014). Cytokiny jsou zodpovědné za syndrom kapilárního úniku, což vede k vývoji typických klinických příznaků. Tyto symptomy byly poprvé popsány u dětí, které trpěly vysokou horečkou, bolestí hlavy, zmateností, vyrážkou, zvracením, průjmem a akutním selháním ledvin (Sospedra a kol., 2012a).

V roce 1980 byl syndrom toxického šoku popsán u mladé menstrující ženy používající tampony. Za rizikový faktor byl označen vysoce absorpční tampon. Toxin TSST-1 je zodpovědný za multiorgánové selhání v téměř 95 % případů, pokud se jedná o syndrom toxického šoku. Doposud existují pouze pravděpodobné důvody, proč k syndromu dochází v této souvislosti (Mitchell a kol., 2015). Základní příčinou smrti u syndromu toxického šoku je hypovolemický šok vedoucí k multiorgánovému selhání (Dinges a kol., 2000).



Obrázek 11 - Znáznornění 3D struktury enterotoxinů *S. aureus* (Hennekinne, 2012)

4 Metody detekce toxinů bakterie *Staphylococcus aureus*

4.1 Přímé metody detekce stafylokokových enterotoxinů

4.1.1 Imunologické metody

Imunologické metody jsou založeny na specifické vazbě antigenu s protilátkou. Pro detekci toxinů *S. aureus* byla popsána řada protilátek, které se používají v různých typech testů (De Boer a kol., 1999).

Reverzní pasivní latexová aglutinace (RPLA)

Latexové aglutinační testy obsahují latexové kuličky, které jsou potaženy protilátkami, aglutinujícími specifické antigeny čili toxiny (De Boer a kol., 1999). Tento test představuje soupravu pro detekci stafylokokových enterotoxinů A, B, C a D. V reverzním aglutinačním testu reaguje protilátka s toxinem a dochází k zesíťování latexových částic díky specifické reakci protilátky s antigenem (toxinem), což vede ke vzniku sraženiny signalizující přítomnost určitého typu enterotoxinu vyskytujícího se například v potravinách (Sospedra a kol., 2013). V případě, že není antigen ve vzorku přítomen nebo je jeho obsah nižší, než je detekční limit testu, k zesíťování nedochází a latexové částice vytvoří sediment na dně jamky mikrotitrační destičky. Falešně negativní výsledky se mohou vyskytnout v případě, pokud je výskyt toxinu nižší než mez detekce RPLA (Bursová a kol., 2014).

Oishi a kol. (2008) vyvinuli reverzní latexový test specifický pro Pantonův-Vanlentinův leukocidin. Tato metoda vykazuje vysokou specifitu a citlivost (Oishi a kol., 2008). RPLA může být využita také pro detekci stafylokokového toxinu syndromu toxického šoku, kdy jsou latexové částice senzibilizovány specifickým anti-TSST-1 imunoglobulinem. I v tomto případě se jedná o velmi citlivou a jednoduchou metodu (Igarashi a kol., 1989).

Imunoreakce se značenými protilátkami (ELISA, RIA, EIA)

ELISA je základní a široce využívaná kolorimetrická metoda, která je obecně nejběžnější metodou pro detekci stafylokokových enterotoxinů. Metody elektrochemické imunoanalýzy jsou jednoduché, citlivé a levné. Komerční sady však mají zpravidla schopnost detekce pouze pěti stafylokokových enterotoxinů A až E. Nejnákladnějším a nejnáročnějším krokem je najít a zakoupit vhodné protilátky (Ďuráčová a kol., 2018). Spolu s technikami RIA a EIA funguje ELISA na základě imunoreakce se značenými protilátkami. U těchto metod je podstatou opět reakce antigenu s protilátkou (Bartůňková a kol., 2011). Existuje mnoho modifikací základní metody ELISA (Obrázek 12) (Ďuráčová a kol., 2018).

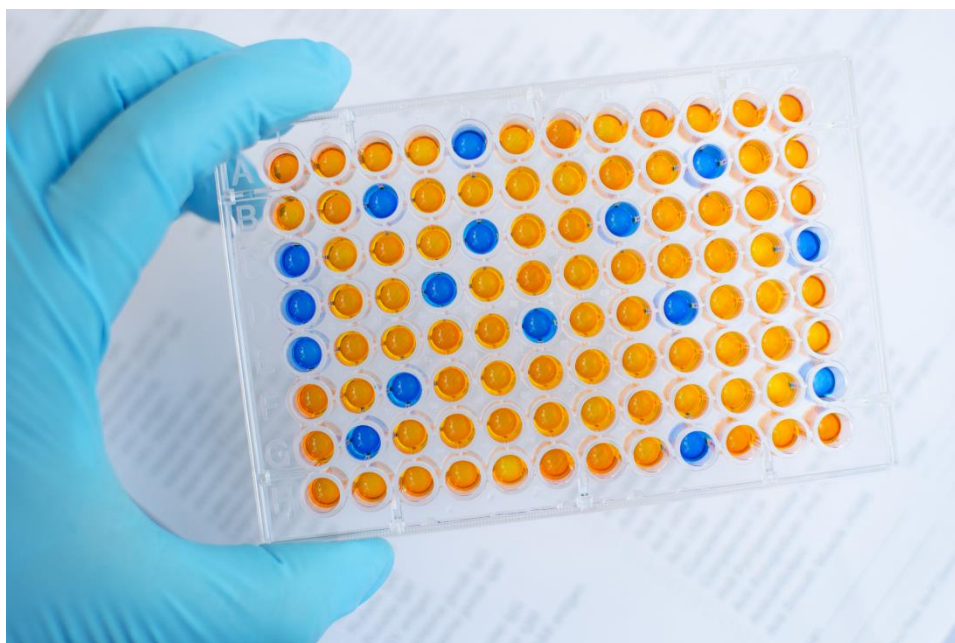
Mezi imunologické testy patří také vysoce citlivá a specifická metoda RIA, u které je radioaktivní značka navázána na antigen, který reaguje se specifickou protilátkou. Množství antigenu v kombinaci s protilátkou se pak stanoví za použití přístroje pro měření radioaktivity. U této metody jsou však vysoké požadavky na specializované vybavení, což z ní činí jednu z nejdražších metod (Ďuráčová a kol., 2018).

Velký zvrat nastal s objevením možnosti navázat molekulu specifické protilátky na enzym. Tato metoda byla nazvána jako EIA čili enzymová imunoanalýza. V současné době se využívá enzym alkalická fosfatáza (křenuvová peroxidáza). Vzniklý enzymový konjugát je možno detekovat například spektrofotometricky a nefelometricky (Bartůňková a kol., 2011).

ELISA je v podstatě druhem elektroimunoanalýzy. Existují dva typy, a to buď heterogenní nekompetitivní neboli sendvičová ELISA, nebo heterogenní kompetitivní ELISA (Bartůňková a kol., 2011). Tato metoda funguje na principu vazby antigenu s protilátkou značenou enzymem, dochází ke štěpení substrátu, což se projeví barevnou změnou. Pro stanovení stafylokokových enterotoxinů se často používá sendvičová ELISA. Detekční limit metody nalezneme v rozmezí $0,1-1 \text{ ng.ml}^{-1}$ (Šťásková a kol., 2012). U metody ELISA stejně jako u RPLA se využívá aglutinace s protilátkou IgG, existuje zde však riziko falešně pozitivních výsledků, protože Fc oblast králíčího nebo myšího IgG reaguje nespecifickou reakcí s proteinem A produkovaným *S. aureus*. Detekční limity se pohybují v rozmezí $0,2$ až 2 ng.ml^{-1} a doba pro testování je až 20 hodin. Kuřecí imunoglobulin IgY na rozdíl od předchozích nereaguje s proteinem A, protože má odlišnou strukturu v Fc oblasti. IgY je

použitelný pro metodu ELISA i LFD a má velký potenciál v oblasti detekce stafylokokových enterotoxinů v potravinách (Wanchun a kol., 2013).

Mezi známé testy ELISA patří například TECRA set a jeho výhodou je, že pomocí vhodných antisér lze stanovit všechny základní stafylokokové enterotoxiny A až E. V současné době jsou již k dispozici také sety pro stanovení enterotoxinu H (Bursova a kol., 2014). Další detekční systémy založené na sendvičovém enzymovém imunotestu jsou TRANSIA PLATE a RIDA SCREEN SET schopné určit stafylokokové enterotoxiny A, B, C, D a E v tekutých i pevných potravinách (Sospedra a kol., 2013).



Obrázek 12 - Klasická 96-jamková destička pro metodu ELISA (www.avidien.com)

Enzymatický fluorescenční imunotest (ELFA)

Metoda ELFA používá pro stanovení stafylokokových enterotoxinů analyzátor VIDAS[®]. Základem ELFA je opět reakce mezi antigenem a protilátkou. Princip je obdobný jako u metody ELISA, ale používá se rozdílný substrát, který je enzymaticky štěpen za vzniku fluorescenčního produktu (Štásková a kol., 2012). Fluorescence je nakonec měřena optickým skenerem v přístroji a automaticky analyzována počítačem (De Boer a kol., 1999).

Pro tuto metodu jsou dostupné komerční soupravy VIDAS[®] SET a VIDAS[®] SET2. S použitím těchto souprav lze metodou detekovat současně sedm různých typů stafylokokových enterotoxinů A, B, C₁, C₂, C₃, D a E. VIDAS[®] SET2 je při prokazování stafylokokových enterotoxinů citlivější než starší VIDAS[®] SET. Větší citlivost je zčásti způsobena použitím nových monoklonálních a polyklonálních protilátek s vysokou afinitou (Vernozy-Rozand a kol., 2004).

Výhodou metody ELFA je, že výsledky detekce stafylokokových enterotoxinů mohou být získány již do 3 hodin, další výhodou je také jednoduchá příprava vzorků. Citlivost metody se pohybuje od 0,5 ng.ml⁻¹ pro SEA a SEB až do 1,0 ng.ml⁻¹ pro zbylé SE (Bursová a kol., 2014). Přestože je ELFA velmi citlivá, jednoduchá a účinná metoda má i své určité nevýhody. Jednou z nevýhod je, že stafylokokové enterotoxiny jsou ve vzorku registrovány jako suma a z výsledku není možné přesně určit, který typ toxinu je ve vzorku přítomen (Bursová a kol., 2014). Mezi další nevýhody patří, že může dojít ke křížové reakci činidel reakce s nesouvisejícími antigeny vyskytujícími se v určitých potravinách (Sospedra a kol., 2013).

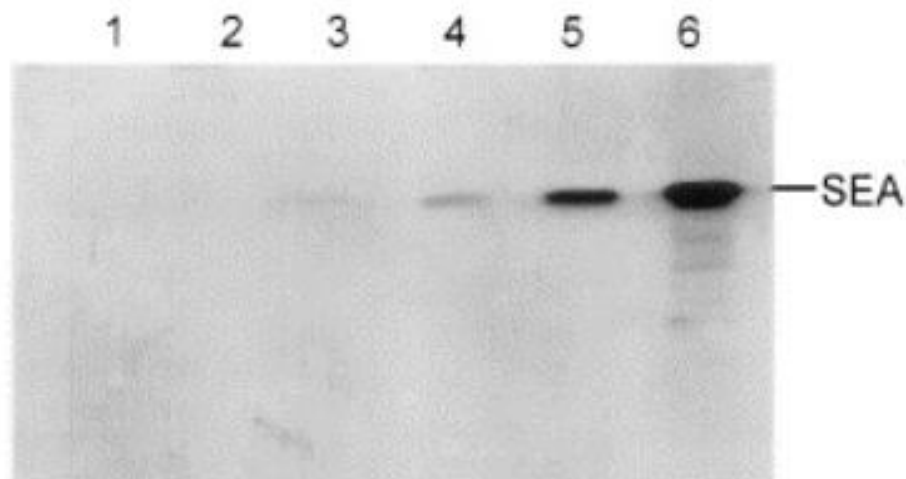
Western blotting

Western blotting je metodou, která má potenciál překonat jedny z hlavních problémů spojených s detekcí toxinů v potravinách, jako je např. zkřížená reaktivita s nesouvisejícími antigeny a necitlivost metod vůči tepelně zpracovaným potravinám. Tepelné zpracování může způsobit agregaci proteinů, tyto agregáty se však rozloží v roztoku dodecylsírany sodného (Rasooly a kol., 1998).

Principem metody je, že nejprve probíhá solubilizace proteinových vzorků, obvykle pomocí dodecylsírany sodného a redukčních činidel. Po solubilizaci jsou jednotlivé proteiny separovány pomocí elektroforézy na polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE), a to na základě jejich molekulové hmotnosti. Následně jsou separované proteiny přeneseny na membránu z nitrocelulózy (Kurien a kol., 2006). Po přenesení proteinů na nitrocelulóзовou membránu jsou převrstveni protilátkami, které jsou značeny chromoforem (Šťátková a kol., 2012).

Metodu western blotting lze použít pro detekci SEA (Obrázek 13). Postupuje se tím způsobem, že se nejprve různé množství SEA elektroforeticky rozdělí pomocí SDS-PAGE, následně jsou rozdělené toxiny přeneseny na nitrocelulóзовou membránu a inkubovány s anti-SEA polyklonálními protilátkami. Komplex antigen-protilátka je poté navázán na sekundární protilátku značenou alkalickou fosfatázou a detekován za použití vhodných chromogenních substrátů (Rasooly a kol., 1998).

Metoda western blotting je vysoce citlivá a lze ji používat pro stanovení nativních i denaturovaných stafylokokových enterotoxinů. Avšak citlivost reakce je závislá na specifitě používaných protilátek, které například pro nové typy enterotoxinů nebyly stále připraveny, což znamená, že tato metoda lze využít pouze pro detekci malé části stafylokokových enterotoxinů (Šťátková a kol., 2012).



Obrázek 13 - Identifikace stafylokokového enterotoxinu A pomocí western blottingu (Rasooly a kol., 1998)

4.1.2 Fyzikálně-chemické metody

Biosenzory

Biosenzory jsou nástroje, které mohou sloužit k monitorování přítomnosti toxinů v potravinách, ale také mohou být využívány v aplikacích biologické bezpečnosti a rychlé diagnostiky (Rajkovic, 2014). Principem je interakce mezi toxinem a povrchově vázaným receptorem, kterým je většinou protilátka. Mezi stafylokokové enterotoxiny, které je možné díky biosenzorům detekovat patří enterotoxin A a B (Bursová a kol., 2014).

Biosenzor je analytické zařízení, které se skládá ze dvou základních složek, a to fyzikálně-chemického převodníku a biorekogniční složky, kterou může představovat enzym, antigen, protilátka nebo také část DNA či RNA. Biorekogniční složka je schopna detekovat stanovený toxin (Pohanka a kol., 2010). Fyzikálně chemický převodník vytváří signál, který značí, zda je toxin ve vzorku přítomen a jeho případné množství. Senzory mohou být např. elektrochemické (Cibiček a kol., 2014).

Nejpoužívanější technikou detekce stafylokokových enterotoxinů jsou elektrické proteinové microarrays jejichž princip funguje na základě sendvičové metody ELISA. Po navázání enzymem značené protilátky na toxin a přidání substrátu nastane enzymová přeměna neaktivního substrátu. Díky této přeměně se vygeneruje elektrický signál a proběhne jeho analýza (Šťástková a kol., 2012).

Biosenzory jsou rychlé, nízkonákladové, citlivé detekční zařízení, které jsou uzpůsobeny pro jednoduchou manipulaci. V posledních letech byly publikovány různé snímací prvky, transdukční technologie a konfigurace biosenzorů pro přímou detekci toxinů z potravin. Nevýhodou biosenzorů je, že při vyšetřování bakteriálních toxinů z potravin může docházet k interferenci s necílenými mikroorganismy (Wang a kol., 2016).

Hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem (MALDI-TOF MS)

Jedná se o rychlou, přesnou a nákladově přijatelnou metodu, která umožňuje identifikaci toxinů *S. aureus* přímo z klinických vzorků (Carbonnelle a kol., 2011). Jde o nejcitlivější metodu, která je v současné době k dispozici, protože poskytuje specifickou a rychlou kvantifikaci množství enterotoxinů ve vzorku (Brun a kol., 2007).

MALDI-TOF MS umožňuje detekci toxinů *S. aureus* ve směsích bez předchozího čištění vzorku. Prvním krokem je tvorba krystalu mezi vzorkem a organickou matricí dále se matrice nechá sušit na vzduchu při laboratorní teplotě. Následně se destička vloží do hmotnostního spektrometru a vysušená směs s matricí a vzorkem je vystavena laseru. Vytvoří se ionty plynné fáze a ty poté pulzují do letové trubice. Při průletu trubicí jsou rozděleny dle poměru hmotnost/náboj (Carbonnelle a kol., 2011). Získaná spektra se poté porovnávají se spektry známých bakteriálních toxinů v retenční knihovně (Sandrin a kol., 2013).

MALDI-TOF MS je vhodným nástrojem, kterým lze detekovat Pantonův-Valentinův leukocidin (Bittar a kol., 2009). Gagnaire a kol. úspěšně detekovali spektrální píky odpovídající *delta*-toxinu ve spektru MALDI-TOF MS (Gagnaire a kol., 2012). Metoda je vhodná také pro použití při detekci stafylokokových enterotoxinů, pro které dosud nebyly připraveny protilátky, které by mohly zajistit jejich využitelnost v imunologických metodách (Šťásková a kol., 2012).

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie je jednou z dalších metod používaných pro kvantitativní i kvalitativní detekci stafylokokových toxinů (Šťásková a kol., 2012). Kapalinový chromatograf se skládá z několika částí, a to rezervoáru mobilní fáze, vysokotlakého čerpadla, nástřikového zařízení, kolony, občas také termostatu, a nakonec zařízení pro detekci analytů a vyhodnocování dat (Meyer, 2010). Na začátku analýzy se vzorek nanese na analytickou kolonu a poté je unášen mobilní fází kolonou. Dostává se do kontaktu s náplní kolony neboli stacionární fází a dojde k separaci na jednotlivé složky vzorku (Bláha a kol., 2000). V počítači jsou poté zaznamenány jednotlivé charakteristiky jako je retenční čas a intenzita píků (Cibiček a kol., 2014).

Před analýzou bakteriálních toxinů musí proběhnout příprava vzorku, včetně extrakčních postupů a čištění extraktu, tento proces je časově velmi náročný. Pro stanovení stafylokokových enterotoxinů se používají kolony s různými stacionárními fázemi. Například pro afinitní chromatografii je využíván specifický peptidový ligand, který je schopen vázat stafylokokový enterotoxin B. Dosud byly chromatografickými metodami stanoveny stafylokokové enterotoxiny A a B (Šťávková a kol., 2012).

Sospedra a kol. se ve své práci zabývá kvantifikací stafylokokového enterotoxinu B ze vzorku mléka pomocí kapalinové chromatografie a detektoru s diodovým polem. Po sérii pokusů byla prokázána dobrá reprodukovatelnost a opakovatelnost metody. Výsledky získané pomocí kapalinové chromatografie a detektoru s diodovým polem byly potvrzeny metodou SET-RPLA. Obě metody umožnily prokázat stafylokokový enterotoxin B (Sospedra a kol., 2012b).

Kapalinová chromatografie s hmotnostním spektrometrem (LC-MS)

Jedná se o vysoce citlivou a specifickou metodu, která kombinuje separaci kapalinovou chromatografií a detekci pomocí hmotnostní spektrometrie (Holčapek a kol., 1997). Bylo vyvinuto několik rozhraní této metody, avšak jejich použití bylo těžkopádné a nespolehlivé. Fenn vyvinul v 80. letech zdroje elektrosprejových iontů, což mělo velký význam pro detekci proteinů a peptidů. Fenn získal za tento objev Nobelovu cenu v roce 2002 (Pitt, 2009).

Metody LC-MS jsou schopny detekovat celé stafylokokové toxiny nebo také jejich fragmenty (Andjelkovic a kol., 2016). Ke stanovení toxinu dojde na základě jeho molekulové hmotnosti a uspořádání jednotlivých aminokyselin (Bursová a kol., 2014). Hlavním problémem metody je extrakce a purifikace proteinových toxinů z potravinové matrice. K získání čistého toxinu pro analýzu je často zapotřebí použití gelů a zdlouhavých procesů purifikace (Andjelkovic a kol., 2016).

Za velmi účinnou techniku detekce stafylokokových enterotoxinů je považována metoda LC-MS s elektrosprejovou ionizací, která dokáže rychle identifikovat a kvantifikovat stafylokokové enterotoxiny A a B ve vzorcích potravin (Sospedra a kol., 2012b). Jako první tuto metodu použili Kientz a kol., kteří prokázali stafylokokový enterotoxin B již při koncentraci 3 pmol.ml⁻¹. LC-MS s elektrosprejovou ionizací má mnoho výhod oproti běžným

technikám jako např. možnost kvantifikace velmi nízkého množství toxinu a není zde nezbytná izolace toxinů z potravy před samotným stanovením (Wu a kol., 2016).

Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE)

Jedná se o elektroforetickou metodu probíhající na polyakrylamidovém gelu za přítomnosti dodecylsulfátu sodného (Bursová a kol., 2014). Díky této metodě dochází k separaci různého množství stafylokokových enterotoxinů (Rasooly a kol., 1998). Separace závisí na délce polypeptidového řetězce, velikosti molekul, molekulární hmotnosti a stupni denaturace toxinu (Laemmli a kol., 1970).

Stafylokokové enterotoxiny mají schopnost vázat sodium dodecyl sulfát, který jim následně dodá záporný náboj a umožní pohyb směrem k anodě (Šťásková a kol., 2012). Stafylokokové enterotoxiny jsou poté elektroforeticky přeneseny na nitroceluloseovou membránu a inkubovány s anti-SEA polyklonálními protilátkami. Vzniklý komplex antigen-protilátka je následně zviditelněn sekundárními protilátkami konjugovanými s alkalickou fosfatázou (Rasooly a kol., 1998).

V roce 2002 Bernardo a kol. pro identifikaci patogenních faktorů použili kmen *S. aureus*. Během stacionární fáze růstu bakterie odebrali vzorek, vyprodukované bakteriální proteiny následně oddělili metodou SDS-PAGE a analyzovali výsledky pomocí MALDI-TOF-MS. V analyzovaném vzorku byly prokázány *alfa*-toxiny i *beta*-toxiny. Identita toxinů byla následně potvrzena pomocí western blott analýzy. Výsledky této studie ukázaly, že kombinovaná analýza pomocí MALDI-TOF-MS a SDS-PAGE poskytuje důležitý nástroj pro vyhodnocení patogenity některých klinických izolátů *S. aureus* (Bernardo a kol., 2002).

4.2 Nepřímé metody detekce stafylokokových enterotoxinů

4.2.1 Molekulárně biologické metody

Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Polymerázová řetězová reakce je jednou z nejpoužívanějších metod při detekci patogenů z potravin. Tato metoda byla vynalezena asi před 30 lety a umožňuje rozpoznání bakteriálního patogenu detekcí specifické cílové sekvence DNA (Law a kol., 2015).

Principem PCR je amplifikace konkrétního úseku DNA *in vitro* (Zourob a kol., 2008). Amplifikace probíhá v cyklickém třístupňovém procesu. Cílová dvouvláknová DNA je při vysoké teplotě denaturována na jednovláknovou DNA. Následně se na vlákna DNA připojí dva jednořetězcové syntetické olinukleotidy nebo specifické primery. Poté probíhá polymerizační proces, kdy jsou primery komplementární k jednovláknové DNA rozšířeny za přítomnosti deoxyribonukleotidů a termostabilní DNA polymerázy (Law a kol., 2015).

Pro analýzu výsledků PCR mohou být využity metody jako je ELISA, hybridizace nebo nejvíce používaná ELFA (Enzymatický fluorescenční imunotest) kdy jsou produkty amplifikace vizualizovány na elektroforetickém gelu jako pásy, které jsou obarveny ethidium bromidem (Bursová a kol., 2014).

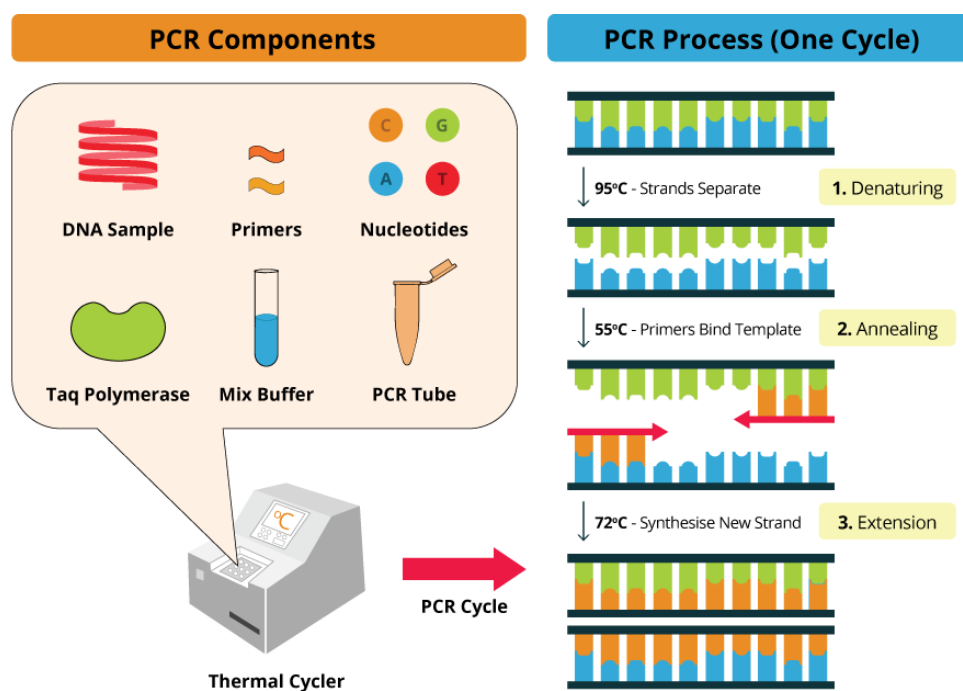
Polymerázová řetězová reakce je schopná identifikovat fragmenty stafylokokových enterotoxinů A, B, C, D, E, G, H a I spolu s toxinem syndromu toxického šoku (TSST-1) (Mclaulin a kol., 2000). Existují primery specifické pro jednotlivé stafylokokové toxiny. PCR je zároveň jedna z nejpoužívanějších metod pro detekci nových stafylokokových enterotoxinů (Šťávková a kol., 2012).

Existuje také multiplexní PCR, která nabízí rychlejší detekci ve srovnání s jednoduchou PCR. Základní princip multiplexní PCR je podobný konvenční PCR. Hlavní rozdíl je v tom, že se u této metody používá více sad specifických primerů, zatímco u klasické PCR pouze jedna sada. Důležitými faktory pro správné provedení metody je vhodná koncentrace primerů, pufru PCR, dále rovnováha mezi koncentracemi chloridu hořečnatého a deoxynukleotidu a další. (Law a kol., 2015). Tento typ PCR dokáže detekovat geny pro stafylokokové enterotoxiny A až E, TSST-1 a exfoliativní toxiny A a B (Løvseth a kol., 2004).

Kvantitativní polymerázová řetězová reakce (Real-time PCR)

Jedná se v podstatě o klasickou PCR (Obrázek 14), která je schopna průběžně kvantifikovat DNA v průběhu všech cyklů (Bursová a kol., 2014). Přírůstky lze monitorovat díky měření fluorescenčního signálu, který je produkován specifickými duálně značenými sondami nebo také interkalačními barvivy. Intenzita fluorescence je úměrná množství syntetizované nukleové kyseliny (Law a kol., 2015).

Pro kombinování univerzálnosti enzymové imunanalýzy (EIA) a schopnosti PCR amplifikovat DNA byla vyvinuta kvantitativní real-time immuno-PCR (qRT-iPCR) vhodná pro detekci stafylokokových enterotoxinů A a B (Fischer a kol., 2007). K dispozici je již také imunokvantitativní real-time PCR (iqPCR) pro detekci SEB, tato metoda byla porovnávána s testem ELISA a bylo zjištěno, že iqPCR je přibližně 1000krát citlivější (Rajkovic a kol., 2006).



Obrázek 14 - Standardní provedení PCR a potřebná činidla (www.bosterbio.com)

DNA čipy (DNA-microarrays)

Olinukleotidové DNA microarrays se skládají ze skleněných sklíček nebo čipů, které jsou potaženy až stovkami specifických olinukleotidových sond a tyto sondy jsou chemicky syntetizované jako krátké sekvence v rozsahu od 25 do 80 bp (Law a kol., 2015). Každá z olinukleotidových sond má schopnost mířit na specifickou část genové sekvence. Vzorky fragmentů nukleové kyseliny (DNA) jsou značeny fluorescenčním barvivem a následně denaturovány za vzniku jednovláknových fragmentů. Fragменты se naváží na odpovídající olinukleotidovou sondu a dochází k jejich hybridizaci. Vzniká komplex sonda-vzorek, který produkuje fluorescenční signál. Intenzita fluorescence je úměrná koncentraci značeného fragmentu nukleové kyseliny (Lauri a kol., 2009).

V roce 2004 Sergeev a kol. vynalezli PCR-microarray assay, která je schopna detekce většího množství genů toxinů *S. aureus* současně. Tato analýza je založena na PCR amplifikaci variabilní oblasti téměř všech známých enterotoxinových genů pomocí degenerovaných primerů. Namnožené variabilní úseky byly nakonec rozpoznány a určeny mikročipem (Sergeev a kol., 2004).

Mikročipy umožňují charakterizaci mikroorganismů a také pochopení patogeneze na základě přítomnosti faktorů virulence (Severgnini a kol., 2011). Předností metody je schopnost kvantitativních i kvalitativních stanovení a také to, že v rámci jedné reakce lze sledovat až několik stovek úseků DNA (Šťávková a kol., 2012).

5 POUŽITÁ LITERATURA

1. **Andjelkovic, M., Tsilia, V., Rajkovic A. [2016].** Application of LC-MS/MS MRM to Determine Staphylococcal Enterotoxins (SEB and SEA) in Milk. *Toxins*, **8**(4), 1-13.
2. **Baba, T., Bae T., Schneewind, O., Takeuchi, F., Hiramatsu, K. [2008].** Genome sequence of *Staphylococcus aureus* strain Newman and comparative analysis of staphylococcal genomes: polymorphism and evolution of two major pathogenicity islands. *Journal of Bacteriology*, **190**, 300-310.
3. **Bachert, C., Gevaert, P., Cauwenberge P. [2002].** *Staphylococcus aureus* superantigens and airway disease. *Current Allergy and Asthma Reports*, **2**(3), 252-258.
4. **Balaban, N., Rasooly, A. [2000].** Staphylococcal enterotoxins. *International Journal of Food Microbiology*, **61**(1), 1-10.
5. **Bartůňková, J., Paulík, M. [2011].** Vyšetřovací metody v imunologii 2., přepracované a doplněné vydání. Praha, 164. ISBN 978-80-247-3533-7.
6. **Bernardo, K., Fleer, S., Pakulat, N., Krut, O. [2002].** Identification of *Staphylococcus aureus* exotoxins by combined sodium dodecyl sulfate gel electrophoresis and matrix-assisted laser desorption/ ionization-time of flight mass spectrometry. *Proteomics*, **2**(6), 740-746.
7. **Berube, B., Wardenburg, J. [2013].** *Staphylococcus aureus* α -Toxin, Nearly a Century of Intrigue. *Toxins*, **5**(6), 1140-1166.
8. **Bhakdi, S., Trantum-Jensen, J. [1991].** *Alpha-Toxin of Staphylococcus aureus*. *American Society for Microbiology*, **55**(4), 735-737.
9. **Bittar, F., Ouchenane, Z., Smati, F., Raoult, D. [2009].** MALDI-TOF-MS for rapid detection of staphylococcal Panton–Valentine leukocidin. *International Journal of Antimicrobial Agents*, **34**(5), 467-470.
10. **Bláha, L., Maršálek, B. [2000].** Methods for detection and quantification of cyanobacterial toxins. *Algological Studies*, **99**, 1-22.

11. **Brown, D. F. J., Edwards, D. I., Hawkey, P. M. [2005].** Guidelines for the laboratory diagnosis and susceptibility testing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **56**(6), 1000-1018.
12. **Brun, V., Dupuis, A., Adrait, A., Marcellin, M. [2007].** Isotope-labeled Protein Standards. *Molecular & Cellular Proteomics*, **6**(12), 2139-2149.
13. **Bukowski, M., Wladyka, B., Dubin, G. [2010].** Exfoliative Toxins of *Staphylococcus aureus*. *Toxins*, **2**(5), 1148-1165.
14. **Bursová, Š., Dušková, M., Necidová, L., Karpíšková, R., Myšková, P. [2014].** Mikrobiologické laboratorní metody. Brno, 84. ISBN 978-80-7305-676-6.
15. **Carbonnelle, E., Mesquita, C., Bille, E. [2011].** MALDI-TOF mass spectrometry tools for bacterial identification in clinical microbiology laboratory. *Clinical Biochemistry*, **44**(1), 104-109.
16. **De Boer, E., Beumer, R. R. [1999].** Methodology for detection and typing of foodborne microorganisms. *International Journal of Food Microbiology*, **50**(1-2), 119-130.
17. **De la Fuente, R., Ballesteros, C., Bautista, V., Medina, A. [2011].** *Staphylococcus aureus* subsp. *anaerobius* isolates from different countries are clonal in nature. *Veterinary Microbiology*, **150**, 198-202.
18. **Dinges, M. M., Orwin, P. M., Schlievert, P. M. [2000].** Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *American Society for Microbiology*, **13**(1), 16-34.
19. **Duracova, M., Klimentova, J., Fucikova, A., Dresler, J. [2018].** Proteomic Methods of Detection and Quantification of Protein Toxins. *Toxins*, **10**(3), 2-7.
20. **Fischer, A., Eiff, Ch., Kuczius, T. [2007].** A quantitative real-time immuno-PCR approach for detection of staphylococcal enterotoxins, *Journal of Molecular Medicine*, **85**(5), 461-469.
21. **Francis, J. S., Doherty, C. M., Lopatin, U., Johnston, C. P., Sinha, G., Ross, T., Cai, M., Hansel, N. N., Perl, T., Ticehurst, J. R., Carroll, K., Thomas, D., Nuermberger, E., Bartlett, J. G. [2005].** Severe Community-Onset Pneumonia in Healthy Adults Caused by Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Carrying the Panton-Valentine Leukocidin Genes. *Clinical Infectious Diseases*, **40**, 100-107.

22. **Gagnaire, J., Dauwalder, O., Boisset, S., Khau, D., Freydiere, A., Florence, A. [2012].** Detection of *Staphylococcus aureus* Delta-Toxin Production by Whole-Cell MALDI-TOF Mass Spectrometry. *Plos One*, **7**(7), 1-6.
23. **Gordon, R. J., Lowy, F. D. [2008].** Pathogenesis of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infection. *Clinical Infectious Diseases*. **46**(5), 350-359.
24. **Greenwood, D., Barer, M. [2012].** Medical microbiology, A guide to microbial infections, pathogenesis, immunity, laboratory diagnosis and control. Nottingham, 794. ISBN 978-0-7020-4089-4.
25. **Hames, B. D. [1998].** Gel Electrophoresis of Proteins, A Practical Approach. Leeds, 345. ISBN 0-19-963641-9.
26. **Harris, L. G., Foster, S. J., Richards, R. G. [2002].** An introduction to *Staphylococcus aureus*, and techniques for identifying and quantifying *S. aureus* adhesins in relation to adhesion to biomaterials: Review. *European Cells and Materials*, **4**, 39-60.
27. **Hennekinne, J. A., De Buyser, M. R., Dragacci, S. [2012].** *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. *FEMS Microbiology Reviews*, **36**(4), 815-836.
28. **Holčápek, M., Jandera, P. [1998].** Spojení kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie (HPLC/MS). *Chemické Listy*, **92**, 278-286.
29. **Horáček, J. [2000].** Základy lékařské mikrobiologie. Praha, 308. ISBN 80-246-0006-4.
30. **Chandel, K. K., Pahadyia, S. [2005].** Sodium Dodecyl Sulfate-Poly Acrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) Technique and Its Applications. *Academia*, 1-3.
31. **Chang, Y. [2013].** Characterization and complete genome sequence analysis of *Staphylococcus aureus* bacteriophage SA12. *Virus Genes*, **47**, 389-393.
32. **Chatterjee, S. S., Otto, M. [2011].** Improved understanding of factors driving methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* epidemic waves. *Clinical Epidemiology*, **5**, 205-217.

33. **Ibberson, C. B., Jones, C. L., Singh, S., Wise, M. C. [2014].** *Staphylococcus aureus* Hyaluronidase Is a CodY-Regulated Virulence Factor. *American Society for Microbiology*, **82**(10), 4253-4264.
34. **Igarashi, H., Fujikawa, H., Shingaki, M. [1986].** Latex Agglutination Test for *Staphylococcal* Toxic Shock Syndrome Toxin 1. *American society for microbiology*, **23**(3), 509-512.
35. **Jevons, M. P. [1961].** “Celbenin”— Resistant Staphylococci. *British Medical Journal*, **1**, 124-125.
36. **Kurien, B., Scofield, R., [2006].** Western blotting. *Methods*, **38**(4), 283-293.
37. **Labbé, R. G., García, S. [2013].** Guide to Foodborne Pathogens, Second Edition. West Sussex, 26-43. ISBN 978-0-470-67142-9.
38. **Ladhani, S. [2003].** Understanding the mechanism of action of the exfoliative toxins of *Staphylococcus aureus*. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, **39**(2), 181-189.
39. **Ladhani, S. [2001].** Recent developments in staphylococcal scalded skin syndrome. *Clinical Microbiology and Infection*, **7**(6), 301-307.
40. **Ladhani, S., Garbash, M. [2005].** Staphylococcal Skin Infections in Children. *Pediatric Drugs*, **7**, 77-102.
41. **Laemmli, U. K. [1970].** Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, **227**(5259), 680-685.
42. **Lauri, A., Mariani, P. O. [2009].** Potentials and limitations of molecular diagnostic methods in food safety. *Genes & Nutrition*, **4**, 1-12.
43. **Law, J. W., Mutalib, N. A., Chan, K. [2015].** Rapid methods for the detection of foodborne bacterial pathogens: principles, applications, advantages and limitations. *Frontiers in Microbiology*, **5**, 1-14.
44. **Lina, G., Piemont, Y., Godail-Gamot, F. [1999].** Involvement of Pantone-Valentine Leukocidin Producing *Staphylococcus aureus* in Primary Skin Infections and Pneumonia. *Clinical Infectious Diseases*, **29**(5), 1128-1132.

45. **Lindsay, J. A. [2010].** Genomic variation and evolution of *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Medical Microbiology*, **300**(2-3), 98-103.
46. **Løvseth, A., Loncarevic, S., Berdal, K. [2004].** Modified Multiplex PCR Method for Detection of Pyrogenic Exotoxin Genes in Staphylococcal Isolates. *Journal of clinical microbiology*, **42**(8), 3869-3872.
47. **Lowy, F. D. [1998].** *Staphylococcus aureus* infections. *The New England Journal of Medicine*, **339**, 520-532.
48. **Mahmood, T., Yang, P. [2012].** Western Blot: Technique, Theory, and Trouble Shooting. *North American Journal of Medical Sciences*, **4**(9), 429-434.
49. **McCormic, J. K., Yarwood, J. M., Schlievert, P. M. [2001].** Toxic shock syndrome and bacterial superantigens. *Annual Review of Microbiology*, **55**, 77-104.
50. **McDougal, L. K., Steward C. D., Killgore, G. E. [2003].** Pulsed-field gel electrophoresis typing of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from the United States establishing a national database. *Journal of Clinical Microbiology*, **41**(11), 5113-5120.
51. **McLauchlin, J., Narayanan, G. L., Mithani, V. [2000].** The Detection of Enterotoxins and Toxic Shock Syndrome Toxin Genes in *Staphylococcus aureus* by Polymerase Chain Reaction. *Journal of Food Protection*, **63**(4), 479-488.
52. **Meyer, R. V. [2010].** Practical High-Performance Liquid Chromatography, Fifth Edition. Switzerland, 426. ISBN 978-0-470-68218-0.
53. **Middleton, J. R. [2008].** *Staphylococcus aureus* antigens and challenges in vaccine development. *Expert Review of Vaccines*, **7**(6), 805-15.
54. **Miljkovic-Selimović, B., Dinić M., Orlović, J., Babić, T. [2015].** *Staphylococcus aureus*: Immunopathogenesis and Human Immunity. *Acta Facultatis Medicae Naissensis*, **32**(4), 243-257.
55. **Mitchell, A. M., Bisch, S., Arntfield, S., Hosseini-Moghaddam, S. M. [2015].** A Confirmed Case of Toxic Shock Syndrome Associated with the Use of a Menstrual Cup. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*, **26**(4), 218-220.

56. **Novick, R. P., Murphy, E., Gryczan, T. J. [1979].** Penicillinase plasmids of *Staphylococcus aureus*: Restriction-deletion maps. *Plasmid*, **2**(1), 109-129.
57. **Oishi, K., Baba, T., Nakatomi, Y., Ito, T. [2008].** A latex agglutination assay for specific detection of Panton-Valentine leukocidin. *Journal of Microbiological Methods*, **75**(3), 411-415.
58. **Oliveira, D., Borges, A., Simões M. [2018].** *Staphylococcus aureus* Toxins and Their Molecular Activity in Infectious Diseases. *Toxins*, **10**(6), 3-10.
59. **Otto, M. [2014].** Staphylococcus aureus toxins. *Current Opinion in Microbiology*, **17**, 32-37.
60. **Peschel, A., Otto M. [2013].** Phenol-soluble modulins and staphylococcal infection. *Nature Reviews Microbiology*, **11**(10), 667-673.
61. **Pitt, J. J. [2009].** Principles and applications of liquid chromatography-mass spectrometry in clinical biochemistry. *The Clinical biochemist Reviews*, **30**(1), 19-34.
62. **Pohanka, M. [2010].** Biologické zbraně. Hradec Králové, 363. ISBN 978-80-7231-342-6.
63. **Prevost, G., Couppie, P., Prevost, P., Gayet, S., Petiau, P., Cribier, B., Monteil, H., Piemont, Y. [1995].** Epidemiological data on *Staphylococcus aureus* strains producing synergohymenotropic toxins. *Journal of Medical Microbiology*, **42**, 237-245.
64. **Rajkovic, A., Moualij, E. B., Uyttendaele, M., Brolet, P. [2006].** Immunoquantitative Real-Time PCR for Detection and Quantification of *Staphylococcus aureus* Enterotoxin B in Foods. *Applied Environmental Microbiology*, **72**(10), 6593-6599.
65. **Rasooly, A., Rebekah, S., Rasooly, B. [1998].** Detection and analysis of Staphylococcal enterotoxin A in food by Western immunoblotting. *International Journal of Food Microbiology*, **41**(3), 205-212.
66. **Rajkovic, A. [2014].** Microbial toxins and low level of foodborne exposure. *Trends in Food Science & Technology*, **38**(2), 149-157.
67. **Sandrin, T. R., Goldstein, J. E., Schumaker, S. [2013].** MALDI TOF MS profiling of bacteria at the strain level. *Mass Spectrometry Reviews*, **32**(3), 188-217.

68. **Scott, D. I. [1989].** Immunoblotting and dot blotting. *Journal of Immunological Methods*, **119**(2), 153-187.
69. **Schmitt, M., Schuler-Schmid, U., Schmidt-Lorenz, W. [1990].** Temperature limits of growth, TNase, and enterotoxin production of *Staphylococcus aureus* strains isolated from foods. *International Journal of Food Microbiology*, **11**, 1-19.
70. **Sospedra, I., Mañes, J., Soriano, J. M. [2012a].** Report of toxic shock syndrome toxin 1 (TSST-1) from *Staphylococcus aureus* isolated in food handlers and surfaces from foodservice establishments. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **80**, 288-290.
71. **Sospedra, I., Soler, C., Mañes, J., Soriano, M. [2012b].** Rapid whole protein quantitation of staphylococcal enterotoxins A and B by liquid chromatography/mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, **1238**, 54-59.
72. **Sospedra, I., Soriano, J. M., Mañes, J. [2013].** Enterotoxinomics: The omic sciences in the study of staphylococcal toxins analyzed in food matrices. *Food Research International*, **54**(1), 1052-1060.
73. **Sergeey, N., Volokhov, D., Chizhikov, V., Rasooly, A. [2004].** Simultaneous analysis of multiple staphylococcal enterotoxin genes by an oligonucleotide microarray assay. *Journal of Clinical Microbiology*, **42**, 2134-2143.
74. **Severgnini, M., Cremonesi, P., Consolandi, C., De Bellis, G. [2011].** Advances in DNA Microarray Technology for the Detection of Foodborne Pathogens. *Food and Bioprocess Technology*, **4**(6), 936-95.
75. **Šťásková, Z., Karpíšková, R., Borkovcová, I. [2012].** Možnosti detekce stafylokokových enterotoxinů. *Chemické listy*, **106**, 745-749.
76. **Vernozy-Rozand, C., Mazuy-Cruchaudet, C., Bavai, C., Richard, Y. [2004].** Comparison of three immunological methods for detecting staphylococcal enterotoxins from food. *Letters in Applied Microbiology*, **39**(6), 490-494.
77. **Votava, M. [2003].** Lékařská mikrobiologie speciální. Brno, 495. ISBN 80-902896-6-5.
78. **Wang, Y., Salazar, J. K. [2016].** Culture-Independent Rapid Detection Methods for Bacterial Pathogens and Toxins in Food Matrices. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, **15**(1), 183-205.

79. **Wanchun, J., Keiko, Y., Mai, I., Noritada, K., Manabu, T., Yusuke, A. [2013].** Application of IgY to sandwich enzyme-linked immunosorbent assays, lateral flow devices, and immunopillar chips for detecting staphylococcal enterotoxins in milk and dairy products. *Journal of Microbiological Methods*, **92**(3), 323-331.
80. **Wieser, A., Schneider, L., Jung, J., Sören, S. [2012].** MALDI-TOF MS in microbiological diagnostics – identification of microorganisms and beyond (mini review). *Applied Microbiology and Biotechnology*, **93**(3), 965-974.
81. **Wilkinson, B. J., Vijaranakul, U., Nadakavukaren, M. J. [1997].** Characterization of an NaCl-sensitive *Staphylococcus aureus* mutant and rescue of the NaCl-sensitive phenotype by glycine betaine but not by other compatible solutes. *American Society for Microbiology*, **63**(5), 1889-1897.
82. **Wu, S., Duan, N., Gu, H., Hao, L., Ye, H., Gong, W., Wang, Z. [2016].** A Review of the Methods for Detection of *Staphylococcus aureus* Enterotoxins. *Toxins*, **8**(7), 1-20.
83. **Zourob, M., Elwary, S., Turner, A. [2008].** Principles of Bacterial Detection. New York, 970. ISBN 978-0-387-75112-2.
84. **www.britannica.com.** *Staphylococcus aureus* [cit. 2019-5-9]. Dostupné z: <https://www.britannica.com/science/Staphylococcus-aureus>
85. **www.tcd.ie.** Microbiology *Staphylococcus* species [cit. 2019-5-9]. Dostupné z: https://www.tcd.ie/Biology_Teaching_Centre/assets/pdf/by2205/by2205-webgalleries2011/by2205-gallery3/staphylococcus%20species.pdf
86. **www.fishersci.ca.** Baird-Parker Agar [cit. 2019-5-9]. Dostupné z: <https://www.fishersci.ca/shop/products/remel-baird-parker-agar/r01108>
87. **www.bosterbio.com.** PCR Fundamental Principles [cit. 2019-5-9]. Dostupné z: https://www.bosterbio.com/protocol-and-troubleshooting/molecular-biology-principle-pcr#gel_electrophoresis
88. **www.avidien.com.** Liquid Handling and the ELISA Protocol [cit. 2019-5-9]. Dostupné z: <https://www.avidien.com/blogs/news/direct-elisa-assay-micropro300-vs-8-channel-handheld-pipette>

89. **www.microbeonline.com**. CAMP test, principle, procedure and results [cit. 2019-6-20]. Dostupné z: <https://microbeonline.com/camp-test-principle-procedure-results/>
90. **www.ebi.ac.uk**. Alpha-hemolysin from *Staphylococcus aureus* [cit. 2019-6-20]. Dostupné z: https://www.ebi.ac.uk/pdbe/entry/search/index/?searchParams=%7B%22q_all_molecule_names%22:%5B%7B%22value%22:%22Alpha-hemolysin%22,%22condition1%22:%22AND%22,%22condition2%22:%22Equal%20to%22%7D%5D,%22resultState%22:%7B%22tabIndex%22:0,%22paginationIndex%22:1,%22perPage%22:%2210%22,%22sortBy%22:%22Sort%20by%22%7D%7D