

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 06: zdravotnictví

Stanovení genetického základu rezistence k antibiotikům u stafylokoků

**Gabriela Relichová
Jihomoravský kraj**

Brno 2022

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 06: zdravotnictví

Stanovení genetického základu rezistence k antibiotikům u stafylokoků

Determination of the genetic basis of resistance to antibiotics in staphylococci

Autor: Gabriela Relichová

Škola: Křenová 304/36, 602 00 Brno

Kraj: Jihomoravský

Konzultant: prof. RNDr. Jiří Doškař, CSc.

Brno 2022

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svou práci SOČ vypracovala samostatně a použila jsem pouze prameny a literaturu uvedené v seznamu bibliografických záznamů.

Prohlašuji, že tištěná verze a elektronická verze soutěžní práce SOČ jsou shodné.

Nemám závažný důvod proti zpřístupnění této práce v souladu se zákonem č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších předpisů.

V Brně dne 20.1.2022

.....

Gabriela Relichová

Poděkování

Velmi ráda bych na tomto místě poděkovala mému konzultantovi, prof. RNDr. Jiřímu Doškařovi, CSc. za trpělivost, čas při zpracování této práce a odborné vedení. Dále vedení Ústavu experimentální biologie za umožnění pracovat v laboratoři.

Děkuji také pracovníkům Laboratoře molekulární diagnostiky mikroorganismů za vstřícnost a cenné rady při laboratorní práci, díky nimž jsem mohla rezistenci k antibiotikům přímo prokázat. Zejména děkuji paní Daně Kadaňkové za její čas a ochotu.

Anotace

Staphylococcus aureus je bakterie běžně se nacházející v lidském těle. Předpokládalo se, že je neškodná a pokud způsobí infekci, dá se snadno zneškodnit antibiotiky. Již pár let po objevení penicilinu se ale zjistilo, že na některé bakterie antibiotika přestávají fungovat. Bakterie si postupně získaly rezistenci. Cílem práce bylo odhalit rezistenci k antibiotikům u koaguláza-pozitivních stafylokoků, izolovat jejich plazmidovou DNA, plazmidy analyzovat za použití restričních enzymů a detekovat na nich geny pro rezistenci. U kmene E9 prokázat multirezistenci a poukázat tím na stále akutnější problém. Čím více se totiž používají antibiotika, tím větší je pravděpodobnost vytvoření dalších multirezistentních kmenů. Geny pro rezistenci byly detekovány na plazmidech, což značně poukazuje na fakt, že mezi bakteriemi dochází k horizontálnímu přenosu genů. To pro ně představuje obrovskou evoluční výhodu. Zároveň by to vysvětlovalo, proč rezistence k antibiotikům vzniká mezi kmeny tak rychle.

Klíčová slova

Rezistence, horizontální přenos genů, *S. aureus*, plazmid, multirezistence

Annotation

Staphylococcus aureus is a common bacterium in the human body. It was supposed to be harmless, and if it caused an infection, it could be easily eliminated by antibiotics. However, only a few years after the discovery of penicillin, antibiotics were found to be ineffective against some types of bacteria. The bacteria were becoming more and more resistant. The aim of this work was to detect antibiotic resistance against coagulase-positive staphylococci, to isolate their plasmid DNA, to analyse plasmids using restriction enzymes and to detect resistance genes on them. In case of strain E9, show multidrug resistance and thus point to an acute problem – the more amounts of antibiotics were used, the forming of new multidrug-resistant strains of bacteria is more probable. We have detected genes for resistance on plasmids, which is a strong indication, that there is horizontal gene transfer between bacteria. This fact is a huge evolutionary advantage for them. It also explains, why antibiotic resistance develops so quickly.

Keywords

Resistance, horizontal gene transfer, *Staphylococcus aureus*, plasmid, multiresistance

Obsah

Seznam zkratek	6
1 Úvod.....	7
1.1 Rezistence k antibiotikům	8
1.2 Horizontální přenos genů (HGT)	9
1.2.1 Konjugace	10
1.2.2 Transformace	10
1.2.3 Transdukce.....	11
1.3 <i>Staphylococcus aureus</i>	12
1.4 Restrikční endonukleázy	12
1.4.1 Restrikční endonukleázy II. třídy.....	12
2 Cíle práce	14
3 Materiál a metody	15
3.1 Bakteriální kmeny	15
3.2 Kultivační média, roztoky a chemikálie.....	15
3.3 Pracovní postupy	17
3.3.1 Testování rezistence k antibiotikům	17
3.3.2 Izolace plazmidové DNA.....	17
3.3.3 Restrikční analýza plazmidů	18
3.3.4 Gelová elektroforéza.....	19
3.3.5 Detekce genů rezistence k antibiotikům	19
4 Výsledky a diskuze	20
4.1 Rezistence k antibiotikům	20
4.2 Izolace plazmidové DNA	23
4.3 Restrikční analýza plazmidu	23
4.4 Gelová elektroforéza	23
4.5 Detekce genů rezistence k antibiotikům	25
5 Závěr	27
6 Použitá literatura	28
7 Seznam obrázků a tabulek	29

Seznam zkratk

HGT	horizontal gene transfer, horizontální přenos genů
MDR	multirezistentní kmeny
MGE.....	mobilní genetické elementy
MPB	masopeptonový bujón
MRSA	meticilin-rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>
PCR.....	polymerase chain reaction, polymerázová řetězová reakce
ÚEB, LMDM.....	Ústav experimentální biologie, Laboratoř molekulární diagnostiky mikroorganismů

1 ÚVOD

V současné době, kdy už přes rok svět žije v pandemii způsobené virem SARSCoV-2, slyšíme denně o testech PCR. Zaujal mě samotný fakt, že existuje test, který z malého množství vzorku zjistí, zda je jedinec pozitivní, či negativní na tento virus. Tento zájem mě přivedl na Přírodovědeckou fakultu MU do Laboratoře molekulární diagnostiky mikroorganismů, kde tuto metodu běžně už dlouhá léta používají k vědeckým pokusům. Zjistila jsem ale, že metoda PCR má spoustu využití a používá se k prokázání nejrůznějších genů.

Jedním ze současných zdravotnických problémů je rezistence bakterií k antibiotikům. Rezistence bakterií k antibiotikům se začala objevovat už krátce po objevení penicilinu. Je to obrana bakterií před jednotlivými antibiotiky a nikdy nebyla takovým problémem jako dnes. Užívání antibiotik samo o sobě není problémem, pokud je v nemocnici člověk s infekcí způsobenou bakterií, pak není jiná možnost než antibiotika nasadit. Problém nastává tehdy, když se antibiotika zneužívají. Mnoho zemí má antibiotika běžně k dostání v lékárnách a k jejich vydání nepotřebujete ani předpis. Lidé je tedy mohou sami užívat i na virová onemocnění. Nejčastěji se tak stává u chřipky.

Na virová onemocnění antibiotika nejen že nefungují, ale mohou jedinci z dlouhodobého hlediska uškodit. Pokud jedinec nadužívá antibiotika, bakterie nacházející se např. na povrchu kůže se mohou stát k tomuto antibiotiku necitlivé (rezistentní). Tak vznikne konkrétní rezistentní kmen. Později, když se náhodou jedinec zraní a do rány si zanesou právě tento rezistentní kmen bakterie, vznikne v ráně infekce, která se už nedá léčit některými antibiotiky.

V současné době už existují bakterie rezistentní k více antibiotikům. Například infekce způsobené kmenem bakterie *Staphylococcus aureus* rezistentní k meticilinu (MRSA) se dá léčit již pouze vankomycinem a je otázkou času, kdy se i k tomuto antibiotiku stane rezistentní. Tyto kmeny tak mohou způsobovat neléčitelná onemocnění, často končící smrtí.

1.1 Rezistence k antibiotikům

Při léčbě bakteriálních onemocnění se nemocnému obvykle podávají vhodná antibiotika. K první zaznamenané léčbě antibiotikem byl použit streptomycin objeven téměř před 80 lety (v roce 1943 v USA), výsledkem léčby bylo k překvapení všech úspěšné vyléčení tuberkulózy. Od té doby bylo objeveno mnoho dalších antibiotik. Antibiotika se začala používat k léčbě v obrovském množství, zároveň s tím se však začaly objevovat první případy rezistence k této léčbě.

V roce 1950 byla světová spotřeba streptomycinu 10 tun. O pět let později se spotřeba zvýšila na 50 tun streptomycinu, 10 tun chloramfenikolu a 10 tun tetracyklinu. U bakterií se začaly vyvíjet rezistence a projevila se přírodní selekce. Odolnější bakterie, v našem případě rezistentní bakterie přežila a šířila se dál. Začaly se tak vytvářet celé rezistentní populace. V prvních studiích z roku 1953 byla zjištěna u čtyř druhů rodu *Shigella* pouze 0,2 procentní rezistence k některému z antibiotik. O 12 let později, kdy byly kmeny *Shigella* izolovány na stejném místě byly zjištěny daleko více znepokojující výsledky. Nejen že se četnost rezistence zvýšila na 58 procent, ale horší bylo zjištění, že kmeny byly rezistentní nejméně ke čtyřem ze šesti testovaných antibiotik a léčiv. Jednalo se o multirezistentní kmeny (MDR) *Shigella dysenteriae*. MDR kmeny se postupně začaly objevovat u mnoho dalších bakterií, jako například u *Mycobacterium tuberculosis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* a dalších. (Snustad a Simmons, 2016, 712).

Dnes je u *S. aureus* studována například rezistence k meticilinu a ostatním podobným beta – laktamovým antibiotikům. Již je znám gen, který je za to zodpovědný, *mecA*, a jeho umístění na chromozomu. Kmeny MRSA však obvykle mají i další geny rezistence k jiným antibiotikům, například k tetracyklinu, streptomycinu, ampicilinu aj. Svoji rezistenci nejspíše získaly transdukcí, o které bude zmínka dále.

Z hlediska rezistence bakterií hrají důležitou roli plazmidy. Jsou to malé kružnicové molekuly DNA, které se replikují a přenášejí nezávisle na bakteriálním chromozomu. V buňce se vyskytují v jednom nebo několika exemplářích. Většina plazmidů není pro buňku nezbytná pro její přežití. Výjimkou jsou případy, kdy je v růstovém prostředí bakterie přítomno antibiotikum, pak je pro bakterii životně důležité, když plazmidy nesou geny pro rezistenci k tomuto antibiotiku. Tento typ rezistentních plazmidů se označuje jako R-plazmidy. Některé z R-plazmidů mají schopnost konjugace, tedy schopnost přenosu kružnicové DNA z jedné bakterie do jiné. Právě konjugativní schopnost R-plazmidů je zodpovědná za rychlé šíření genů pro rezistenci k antibiotikům. Bakteriální konjugace umožní přenos kopie plazmidu z rezistentního organismu na organismus citlivý. Ten pak nabytou rezistenci epidemicky šíří dále do celé bakteriální populace. Navíc tato konjugativní schopnost umožňuje horizontální přenos R-plazmidů nejen mezi organismy různých druhů, ale dokonce i různých rodů, které nejsou evolučně spřízněny.

Jedním z důvodů rychlé evoluce je tedy již výše zmíněné nadměrné užívání antibiotik. Často jsou totiž předepisována i na virová onemocnění. V mnoha zemích jsou také pacienti bráni spíše jako klienti a lékaři chtějí svým klientům vyhovět. Dalším problémem je široké používání antibiotik, a to například jako podpora růstu v krmivech pro zvířata, nebo v mýdlech. Ve Spojených státech amerických se používají antibiotika v množství 2 až 50 gramů na tunu krmiva. Pokud chceme zpomalit evoluci rezistentních populací, musíme omezit toto nadměrné užívání. V současné době je ve dvou zemích již výrazně omezeno užívání antibiotik, a to buďto jejich zákazem, nebo omezením používání všech antibiotik pouze k terapeutickým účelům. (Snustad a Simmons, 2016, 712).

1.2 Horizontální přenos genů (HGT)

Pro rychlý přenos různých genetických informací u bakterií je velmi užitečný horizontální přenos genů (HGT). Na rozdíl od vertikálního přenosu genů zde může být přenesena genetická informace, aniž by se jednalo o rodiče a potomka. Nejen, že může probíhat mezi rody, druhy a čeleděmi, ale i mezi říšemi a doménami (Hulatová, 2016). U prokaryot nedochází k mitóze a meióze, ale diverzita je zajištěná velkým množstvím mutací a právě HGT. HGT nese i významnou roli v evoluci prokaryot. Zpočátku bylo velmi málo druhů bakterií a všechny se spolu množily spíše jako jeden celek. Proto byl HGT nejčastějším typem přenosu genetické informace. Postupem času se jeho četnost zmenšila (Vogan a Higgs, 2011). Další výhodou pro HGT je jeho rychlost, a to zhruba 31 kbp za milion let. Zatímco u bakterií s větším genomem mohou geny získané HGT tvořit až 18% velikosti genomu, u bakterií s menším genomem často nenacházíme žádné. Není tedy divu při tak velké rozmanitosti HGT, že pro něj přenos rezistence není problém.

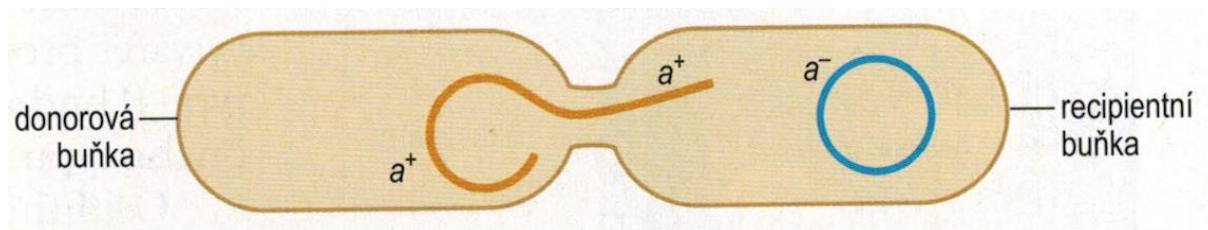
HGT má mnoho výhod i nevýhod. Pokud je pro bakterii výhodné získat určitý gen, nemusí čekat na případnou mutaci, neboť to by trvalo daleko delší dobu, a zda vůbec. Navíc pokud je nějaký gen důležitý, například geny pro rRNA, je v genomu bakterie více kopií a donorové buňce tedy po přenosu nechybí. Dalším důkazem výhod je, že rezistence se většinou nachází na mobilních genetických elementech (MGE), což jsou fragmenty DNA kódující geny. MGE jsou obecně často postradatelné, myšleno ale tak, že se snadno a lehce dají přenést a jejich přenosem nedojde k lyzi buňky. Nekódují totiž žádné životně důležité funkce, ale tvoří takzvaný doplňkový genom. Do MGE patří plazmidy, transpozony, bakteriofágy atd. HGT má však i mnoho nevýhod, neboť častým přenosem dochází ke zvětšování genomu a prodlužování času replikace. V bakterii se navíc objevují i zbytečné nefunkční geny. Tomu je tak často proto, že bakterie už daný gen má a druhý stejný proto není potřeba, nebo proto, že získaný gen potřebuje nějaké predispozice, které bakterie ovšem nemá. Daleko horší situace nastává, když nová sekvence nahradí životně důležitý gen. U bakterie potom dochází k lyzi (Hulatová, 2016).

HGT se uskutečňuje konjugací, transformací, nebo transdukcí. O dalších mechanismech HGT se ale neustále spekuluje.

1.2.1 Konjugace

Mechanismus HGT, při kterém si buňky mezi sebou vytvoří konjugální kanál, kterým se následně genetická informace volně, nebo v podobě plazmidu, či transpozonu přeneše z donorové buňky na recipientní. Je nejběžnější u bakterií, ale můžeme se s ní setkat i u eukaryot a archeí, např. u nálevníků. Průběh tohoto děje velmi závisí na stavbě buněčné stěny. Nejčastěji konjugace probíhá u *E. coli*, jedná se konkrétně o přenos F-plazmidu. Naopak u *S. aureus* najdeme konjugaci jen zřídka, nejběžnějším mechanismem HGT u něj je totiž transdukce (Hulatová, 2016).

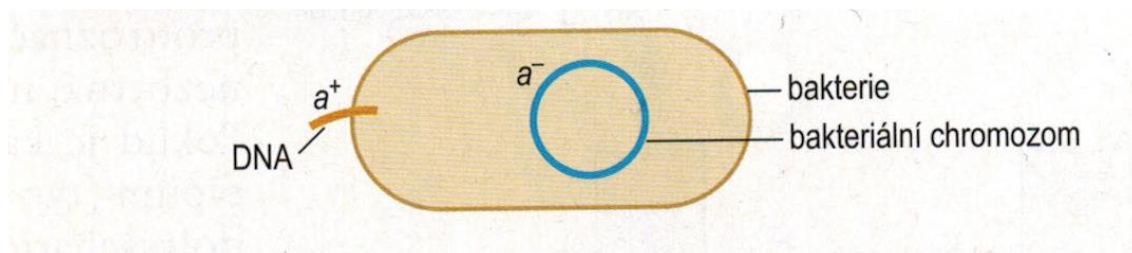
Obrázek 1: Přenos alely a^+ konjugací z donorové do recipientní buňky (Snustad a Simmons, 2016, 173)



1.2.2 Transformace

Při transformaci se z donorové buňky dostane DNA do vnějšího prostředí, buďto z buněk, které ji dokážou cíleně uvolňovat, dochází u nich k expresi membránových proteinů, čímž se DNA dostane pryč z buňky, nebo po odumření nějaké donorové buňky. DNA se dostane do vnějšího prostředí buňky a recipientní buňka ji poté přijme. Buňka cizorodou DNA nejspíše přijímá za účelem potravy, nebo k opravení svých genů a snadnější adaptaci. Stejně jako u konjugace i zde záleží na stavbě buněčné stěny. Ovlivňuje to hlavně četnost transformace (Hulatová, 2016).

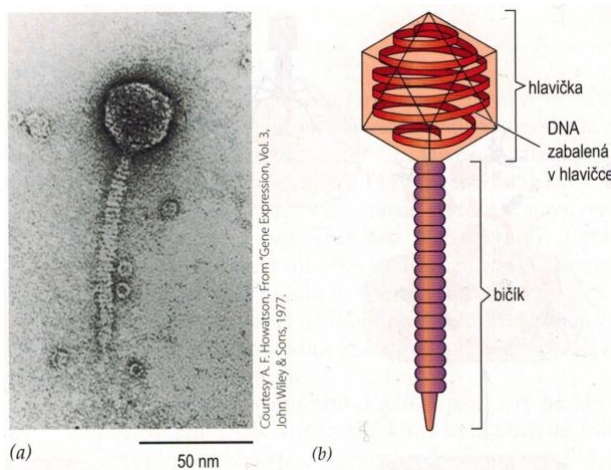
Obrázek 2: Přenos alely a^+ transformací z donorové do recipientní buňky (Snustad a Simmons, 2016,173)



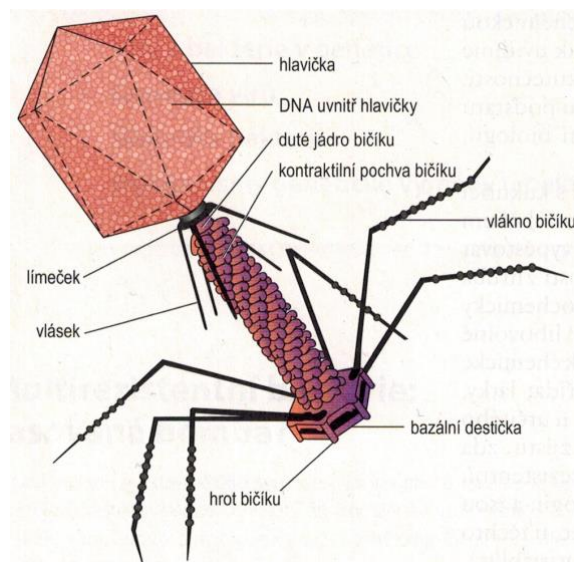
1.2.3 Transdukce

Transdukce je děj, při kterém se genetická informace přenáší pomocí virové částice. Virová částice – bakteriofág, je tvořen bílkovinou a DNA, která se balí do jeho fágové hlavičky. Obecně ho ale můžeme rozdělit na pět hlavních částí: fágovou hlavičku, límeček, kontraktální pochvu, bazální destičku a bičíková vlákna.

Obrázek 3: Bakteriofág λ , který infikuje buňky *E. coli* (Snustad a Simmons, 2016,168)

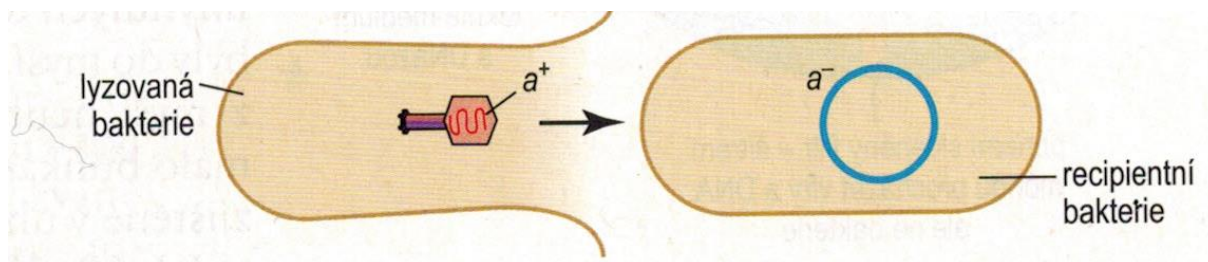


Obrázek 4: Bakteriofág T4, který infikuje buňky *E. coli* (Snustad a Simmons, 2016,166)



Při balení DNA do fágové hlavičky občas dojde k chybě, může se do ní sbalit část chromozomu bakterie, nebo plazmid. Pokud se na sbaleném genu objeví informace o rezistenci, recipientní buňka, do které je tento gen poté také vpraven, se stává rezistentní (Hulatová, 2016).

Obrázek 5: Přenos alely a^+ transdukci z donorové do recipientní buňky (Snustad a Simmons, 2016,173)



1.3 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus je mikroorganismus běžně přítomný v našem těle, kde je spolu s dalšími mikroorganismy součástí lidského mikrobiomu. Je to grampozitivní bakterie většinou neškodná a odhaduje se, že asi 20 až 30 procent lidské populace má *S. aureus* v těle. Někdy však může v těle působit jako patogen podmiňující různé typy infekcí. Na pokožce může *S. aureus* vyvolat tvorbu pupíků nebo i hnisavých zánětů, změny tukového podkožního vaziva (celulitidu) a jiné. Tato bakterie však může vyvolat i velmi závažná onemocnění jako například zánět plic, zánět mozkových blan (meningitidu) a další. Při napadení organismu produkuje bakterie toxiny, které ničí tkáň nemocného, a přitom se tvoří žlutý (zlatý) pigment, podle kterého vznikl druhový název *aureus*.

1.4 Restrikční endonukleázy

Jsou to specifické endonukleázy, které vytváří většina bakteriálních druhů. Bakterie je tvoří za účelem degradace cizorodé DNA, která se do bakterie může dostat např. při nakažení bakteriofágem. Restrikční endonukleázy rozlišujeme podle aktivity na tři typy I, II a III, nejvýznamnější z nich jsou endonukleázy II. typu neboli II. třídy.

1.4.1 Restrikční endonukleázy II. třídy

V současné době jich známe přes 3500 druhů často lišících se citlivostí k metylaci, rozpoznávajících zhruba 160 různých sekvencí. Různé enzymy rozpoznávající stejnou sekvenci nazýváme izochizomery. Sekvence, kterou dokáže restrikční enzym rozeznat tvoří obvykle 4-8 nukleotidů, toto místo je často palindrom. Rozlišujeme zrcadlový palindrom (např. CTAATC) a invertovaný palindrom, kdy palindrom najdeme mezi komplementárními řetězci (např. GAATTC, na kompl. řetězci – CTTAAG) (labguide.cz).

Některé endonukleázy jsou schopné rozlišit více sekvencí blízké příbuzných, hovoříme o relaxované (uvolněné) specifitě. Příkladem je enzym EcoRI, který kromě sekvence G^AATTC může za určitých reakčních podmínek štěpit i sekvence GGATTC, GGATTT a AGATTT.

Molekuly DNA se rozštěpí hydrolýzou fosfodiesterových vazeb obou řetězců v restrikčním místě. Restrikční místo neboli také místo štěpení bývá uvnitř, nebo těsně vedle rozpoznávané sekvence. Produktem děje jsou restrikční fragmenty, které podle způsobu rozštěpení, mohou být zakončené 5' - jednořetězcovými přesahujícími konci, 3' - jednořetězcovými přesahujícími konci, nebo tupými konci.

Názvy restrikční endonukleázy dostávají podle počátečního písmene rodového a prvních dvou písmen druhového jména organismu, ze kterého byly izolovány. Pokud kmen produkuje více než jednu restrikční endonukleázu, jsou mezi sebou rozlišeny římskými číslicemi podle jejich postupné identifikace (Šmarda et al., 2005, 19).

2 CÍLE PRÁCE

Cílem práce bylo stanovit rezistenci k antibiotikům u vybraných kmenů druhu *S. aureus* a identifikovat genetický základ způsobující tuto rezistenci.

Dílčí cíle:

1. Stanovit rezistenci k antibiotikům diskovou metodou
2. Pomocí gelové elektroforézy zjistit, zda rezistentní kmeny obsahují plazmidy
3. Prokázat přítomnost genu pro rezistenci pomocí PCR

3 MATERIÁL A METODY

3.1 Bakteriální kmeny

V práci byly analyzovány 4 kmeny *S. aureus*, které jsem získala v Laboratoři molekulární diagnostiky ÚEB. Přesný původ odebraných vzorků je uveden v tabulce (Tab.1). Bezprofágový kmen *S. aureus* RN 4220 byl používán jako negativní kontrola, kmeny *S. aureus* RN 4220 (pCN51) a RN 4220 (pT181) byly hlavními zkoumanými kmeny a MRSA kmen E9 byl použit k důkazu multirezistence.

Tabulka 1: Původ analyzovaných kmenů *S. aureus*

<i>S. aureus</i>	Původ	Vznik
RN4220	Univerzita Tübingen	bezprofágový kmen připravený v laboratoři
E9	FN Brno	popáleniny, r. 2000
RN 4220 (pCN51)	ÚEB, LMDM	Připravený v laboratoři – transduktant obsahující plazmid (pCN51)
RN 4220 (pT181)	ÚEB, LMDM	izolace z kmene COL - transduktant obsahující plazmid (pT181)

3.2 Kultivační média, roztoky a chemikálie

MPB (masopeptonový bujón)

Živný bujón (Oxoid) 13 g
Kvasnicový extrakt (Oxoid) 3 g
Pepton (Imuna) 5 g
Destilovaná voda 1 l

MPA (masopeptonový agar)

Živný bujón (Oxoid) 13 g
Kvasnicový extrakt (Oxoid) 3 g
Pepton (Imuna) 5 g
Agar (Oxoid) 15 g
Destilovaná voda 1 l

PBS

NaCl 8 g
KCl 0,2 g
Na₂HPO₄·2H₂O 1,95 g
KH₂PO₄ 0,24 g
H₂O 800 ml
Upraveno na pH 7,4 a doplněno vodou do 1 l

50x TAE (TRIS-acetátový pufr)

TRIS 242 g
Ledová kyselina octová 57,1 ml

0,5M EDTA (pH = 8) 100 ml
Doplněno destilovanou vodou do objemu 1 l

1x TAE (TRIS-acetátový pufr)

50x TAE 20 ml
Destilovaná voda 980 ml

Agaróza

SERVA (Lachema)

DNA markery

DNA Ladder, Supercoiled (Merck KGaA, Darmstadt, Germany and/or affiliates, 2067–16210 bp)
100 bp DNA Ladder (New England BioLabs Inc., 100–1517 bp)

Nanášecí pufr

Bromfenolová modř 0,15 g
Sacharóza 24 g
Doplněno vodou do objemu 60 ml

Směs na barvení gelů

Etidium bromid 60 µl
TAE 60 ml

Disky s antibiotiky

Tetracyklin (30 µg), erytromycin (15 µg), streptomycin (25 µg), chloramfenikol (30 µg), ampicilin (10 µg)

Lyzostafin (Sigma)

Restrikční endonukleáza

*Hind*III (New England BioLabs Inc.)

Materiál na PCR

Primery (viz Tab.2)
Master Mix with Standard Buffer (New England BioLabs Inc.)

Tabulka 2: PCR primery využitě pro detekci genů rezistence k antibiotikům

Primer	Sekvence	Velikost produktu (bp)
ermC1	5'-CTT GTT GAT CAC GAT AAT TTC C-3'	299
ermC2	5'-ATC TTT TAG CAA ACC CGT ATT C-3'	
tetK-F	5'-TCG ATA GGA ACA GCA GTA-3'	169
tetK-R	5'-CAG CAG ATC CTA CTC CTT-3'	

ermC...gen pro rezistenci k erytromycinu, tetK...gen pro rezistenci k tetracyklinu

3.3 Pracovní postupy

3.3.1 Testování rezistence k antibiotikům

Disková difúzní metoda

1. 20 μ l zásobní kultury bylo očkováno do 20 ml MPB a inkubováno přes noc ve 37 °C.
2. Kultura byla naředěna na 0,5 OD (odpovídající 150 milionům buněk/ml).
3. 200 μ l naředěné kultury bylo přidáno do MPSA (masopeptonového soft agaru) a rovnoměrně vylito na Petriho misku.
4. Po zaschnutí byly na misku s kulturou rozmístěny disky s antibiotiky a kultura byla inkubována 20 h při 37 °C.
5. Po inkubaci byly změřeny průměry inhibičních zón kolem disků a srovnány s referenční hodnotou.

3.3.2 Izolace plazmidové DNA

- izolační kit „Plasmid DNA purification (Macherey-Nagel)“

1. 20 μ l kultury očkovat do 20 ml MPB (18 hod/37 °C).
2. Centrifugovat 1-3 ml kultury v 15 ml kónických zkumavkách 15 min., 4000 otáček, 10 °C, slít.
3. Sediment promýt v 5 ml PBS (roztok solí), centrifugovat 15 min., 4000 ot., slít.
4. Přidat 250 μ l roztoku A1, resuspendovat. Přenést do 1,5 ml Eppendorf. zkumavky
5. Přidat 20 μ l lyzostafinu, výsl. 50 μ g/ml (zás. 0,5 mg/ml).
6. Lyzovat 45 min. až 2 hod. při 37 °C, dokud nedojde k lyzi.
7. Přidat 250 μ l roztoku A2, promíchat převrácením, nechat stát 5 min. při pokojové teplotě.
8. Přidat 300 μ l roztoku A3, promíchat pomalým převrácením.
9. Centrifugovat 10 min., 13 000 ot., supernatant musí být čistý.
10. Přepipetovat na kolonku, centrif. 1 min., 13 000 ot. Vyměnit sběrnou zkumavku.
11. Přidat 500 μ l roztoku AW nahřátého na 50 °C, centrif. 1 min, 13 000 ot. Vyměnit sběrnou zkumavku.
12. Přidat 600 μ l roztoku A4, centrif. 1 min, 13 000 ot.
13. Centrif. na sucho 1 min, 13 000 ot. v čisté Eppendorf. zkumavce
14. Přidat 50 μ l roztoku AE (eluční pufr) – 25 μ l nechat stát 3 min., centrif. 1 min., 13 000 ot., dalších 25 μ l, nechat 3 min. stát, centrif. znovu 1 min., 13 000 ot.
15. DNA plazmidu uchovat při -20 °C.

Izolace lze udělat i bez zakoupeného kitu, jediným rozdílem je vlastnoruční příprava roztoků A1, A2, A3, A4.

Tabulka 3: Složení roztoků A1, A2, A3, A4, které můžeme použít pro izolaci plazmidové DNA bez použití kitu

A1	A	50 mM glukóza
		25 mM Tris.Cl (pH 8,0)
		10 mM EDTA (detergent)
		Roztok sterilizovat autoklávováním 15 min./121 °C
		Uchovávat při 4 °C
A2	B (čerstvě připravený)	0,2 M NaOH (čerstvě naředěné z 10 M zásobního roztoku)
		1 % SDS
A3	C (předem vychlazený na ledu)	5 M octan draselný 60 ml
		ledová kyselina octová 11,5 ml
		H ₂ O 28,5 ml
		Výsledný roztok je 3M ve vztahu k K ⁺ a 5 M ve vztahu k acetátu.
A4	TE pufr	TE pufr
		10 mM Tris.Cl, pH 8,0
		1 m M EDTA
		Roztok sterilizovat autoklávováním 20 min/121 °C.

3.3.3 Restrikční analýza plazmidů

1. Restrikční směs o objemu 20 µl byla vytvořena smícháním destilované vody, vzorku v množství obsahujícím 1 µg DNA, 2 µl vhodného pufru a 5 U restrikčního enzymu.
2. Směs byla lehce promíchána pipetou a centrifugována několik vteřin při 7000 rpm.
3. Mikrozskumavky s restrikční směsí byly pokryty parafinovým filmem a inkubovány přes noc ve 37 °C.

3.3.4 Gelová elektroforéza

1. Byl připraven 1,2 % agarózový gel o výšce 5 mm a šířce a délce formy rozvařením odpovídajícího množství agarózy (SERVA) v 1xTAE pufru.
2. Gel byl po ztuhnutí vložen do elektroforetické vany (Biometra) s TAE pufrém a bylo na něj naneseo 8 μ l vzorku smíchaného s nanášecím pufrém.
3. Poté do jedné z vaniček na gelu naneseo 4 μ l markeru Supercoiled Ladder – hmotnostní standard.
4. Napětí pro elektroforetickou separaci bylo nastaveno podle délky vany (5,5 V/cm).
5. Po skončení separace (přibližně 1 hod) byl gel barven v roztoku ethidium bromidu nejméně 15 minut, promyt ve vodě a DNA byla zviditelněna a focena v UV záření vlnové délky 365 nm.

3.3.5 Detekce genů rezistence k antibiotikům

Pro detekci genů pro rezistenci byla provedena metoda PCR. Složení PCR směsi a proces děje je popsán v tabulkách (Tab.4, Tab.5). Testovaná DNA byla naředěná na koncentraci 7 μ g/ml.

1. Do eppendorfových zkumavek přidána namíchaná PCR směs (Tab.4) obsahující požadovanou templátovou DNA.
2. Eppendorfovy zkumavky vloženy do termocyklu.
3. Spuštění termocyklu nastaveného na příslušný program PCR (Tab.5).
4. Vyjmutí roztoků z termocyklu a provedení gelové elektroforézy.

Tabulka 4: PCR směs pro celkový objem 25 μ l, 50 μ l a obecná koncentrace (New England BioLabs Inc.)

komponenty	25 μ l RXN	50 μ l RXN	finální koncentrace
2X Master Mix with Standar Buffer	12,5 μ l	25 μ l	1X
10 μ M Forward primer	0,5 μ l	1 μ l	0,2 μ M
10 μ M Reverse primer	0,5 μ l	1 μ l	0,2 μ M
templátová DNA	3 μ l	proměnná	< 1000 ng
voda	do 25 μ l	do 50 μ l	

Tabulka 5: Program PCR (New England BioLabs Inc.)

krok	teplota	čas	
počáteční denaturace	94 °C	30´	
denaturace	94 °C	15-30´	opakovat x krát - libovolný počet cyklů
nasedání primerů	45-68 °C	15-60´	
prodlužování primerů	68 °C	1 min./kb	
závěrečné prodlužování primerů	68 °C	5 min.	
uchování	4-10 °C		

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

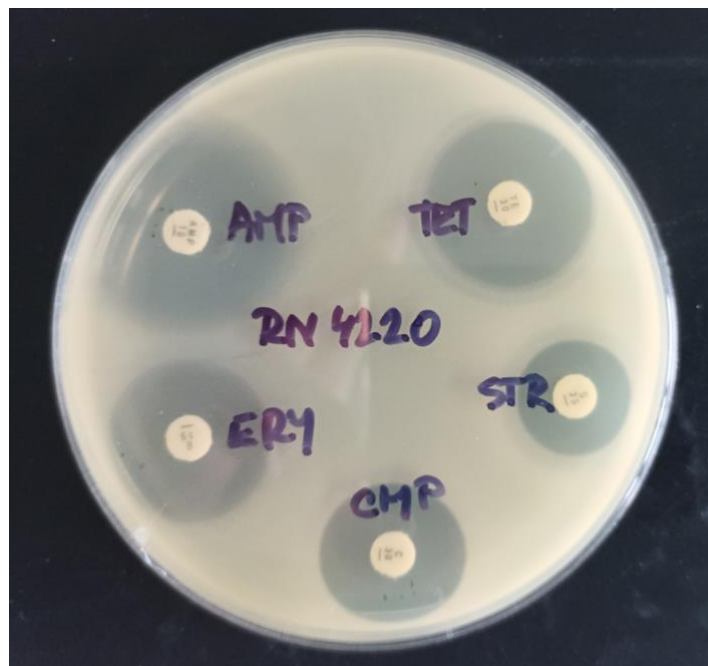
4.1 Rezistence k antibiotikům

Rezistence k antibiotikům byla testována diskovou difúzní metodou. Jako testovaná kultura byly použity kmeny *S. aureus* RN4220, RN4220 (pCN51), RN4220 (pT181). Používané disky byly napuštěny tetracyklinem, streptomycinem, chloramfenikolem, erythromycinem a ampicilinem. Podle průměru inhibičních zón byla stanovena citlivost či rezistence k antibiotikům.

Pro dokázání multirezistence byl použit MRSA E9. Právě multirezistentní kmeny jsou totiž největším současným problémem. Na důkaz rezistence byly použity disky se streptomycinem, ampicilinem a tetracyklinem.

Výsledky byly následující:

Obrázek 6: Stanovení rezistence kmene *S. aureus* RN 4220 k antibiotikům diskovou difúzní metodou



Použitá antibiotika: TET = tetracyklin, STR = streptomycin, CMP = chloramfenikol, ERY = erythromycin, AMP = ampicilin

S. aureus RN 4220 je citlivý na všechna testovaná antibiotika (průměr inhibičních zón je větší než hraniční hodnota), tudíž tato antibiotika můžeme použít k léčbě infekcí jím způsobenými.

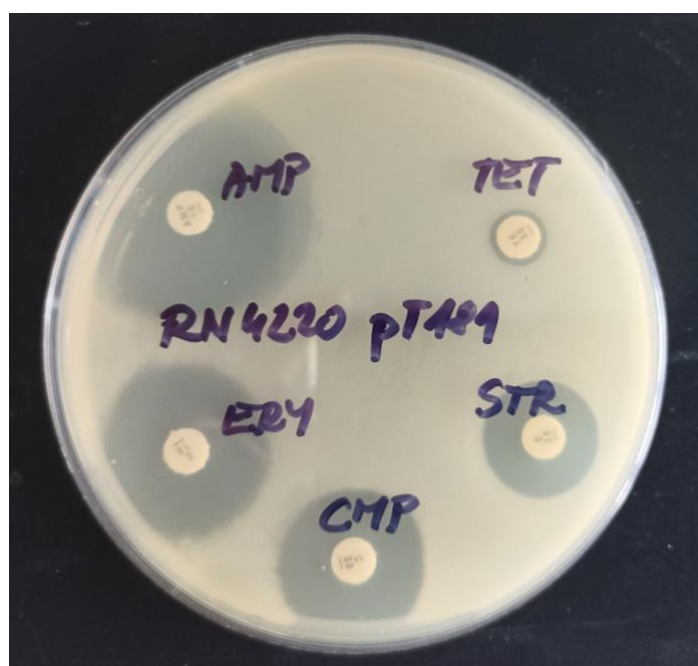
Obrázek 7: Stanovení rezistence kmene *S. aureus* RN 4220 (pCN51) k antibiotikům diskovou difúzní metodou



Použitá antibiotika: TET = tetracyklin, STR = streptomycin, CMP = chloramfenikol, ERY = erythromycin, AMP = ampicilin

Kmen RN4220 (pCN51) je rezistentní k erythromycinu. Ke všem ostatním zkoumaným antibiotikům je ale citlivý.

Obrázek 8: Stanovení rezistence kmene *S. aureus* RN 4220 (pT181) k antibiotikům diskovou difúzní metodou



Použitá antibiotika: TET = tetracyklin, STR = streptomycin, CMP = chloramfenikol, ERY = erythromycin, AMP = ampicilin

Kmen RN4220 (pT181) je rezistentní k tetracyklinu. Ke všem ostatním zkoumaným antibiotikům je ale citlivý.

Obrázek 9: Stanovení rezistence MRSA E9 k antibiotikům diskovou difúzní metodou



Použitá antibiotika: AMP = ampicilin TET = tetracyklin, STR = streptomycin

Naopak kmen *S. aureus* zvaný MRSA s plazmidem E9 je ke všem těmto zkoumaným antibiotikům rezistentní. Jedná se totiž o multirezistentní kmen. Je tedy velmi obtížné léčit pacienty s infekcí, způsobenou tímto kmenem *S. aureus*.

Disková metoda prokázala, že přenosem plazmidů (pCN51) a (pT181) získávají kmeny odpovídající rezistenci k antibiotiku erythromycinu, respektive tetracyklinu.

Kmen E9 z nemocničního prostředí vykázal rezistenci ke všem testovaným antibiotikům.

Chtěli jsme zjistit jaký je mezi kmeny rozdíl. Všechny zkoumané bakterie jsou *S. aureus*, proč tedy mají odlišné reakce k výše uvedeným antibiotikům? Odpověď najdeme v genetické informaci, kterou zkoumané bakterie nesou, jedná se konkrétně o plazmidovou DNA. K rozboru plazmidové DNA byla využita gelová elektroforéza a metoda PCR. Zmíněným metodám ale musí předcházet izolace plazmidové DNA od celkové genetické informace a zbytku buňky.

4.2 Izolace plazmidové DNA

Pro funkčnost dalších metod musíme změřit koncentraci DNA v pufru pomocí nanotropu. Pokud by byla koncentrace příliš nízká, navazující metody by nereagovaly správně. V případě nízké koncentrace DNA musíme izolaci provést znovu.

Tabulka 6: Koncentrace izolované plazmidové DNA

Plazmid	(pCN51)	(pT181)
Koncentrace (µg/ml)	28	33

4.3 Restrikční analýza plazmidu

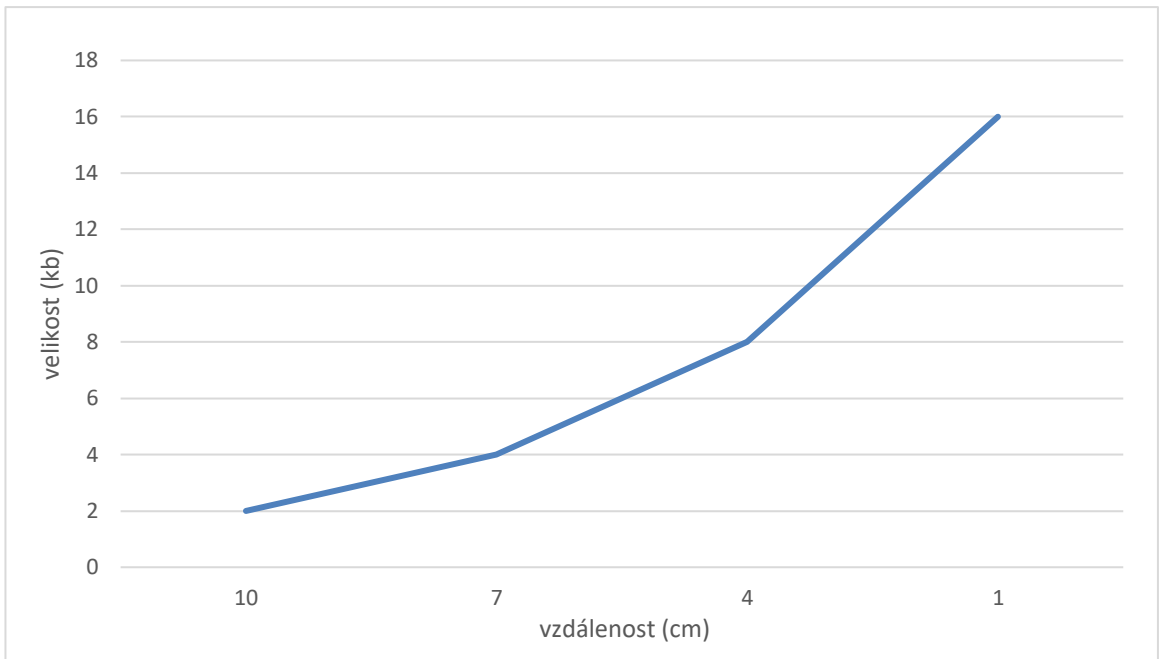
Pro přehlednější výsledky elektroforézy byl použit restrikční enzym. Byl přidán několik hodin před provedením elektroforézy. Restrikční enzym rozštěpí plazmidy a výsledky jsou poté přesnější. Použili jsme restrikční enzym *HindIII*, který štěpí plazmidy v sekvenci A[^]AGCTT (eshop.biogen.cz)

4.4 Gelová elektroforéza

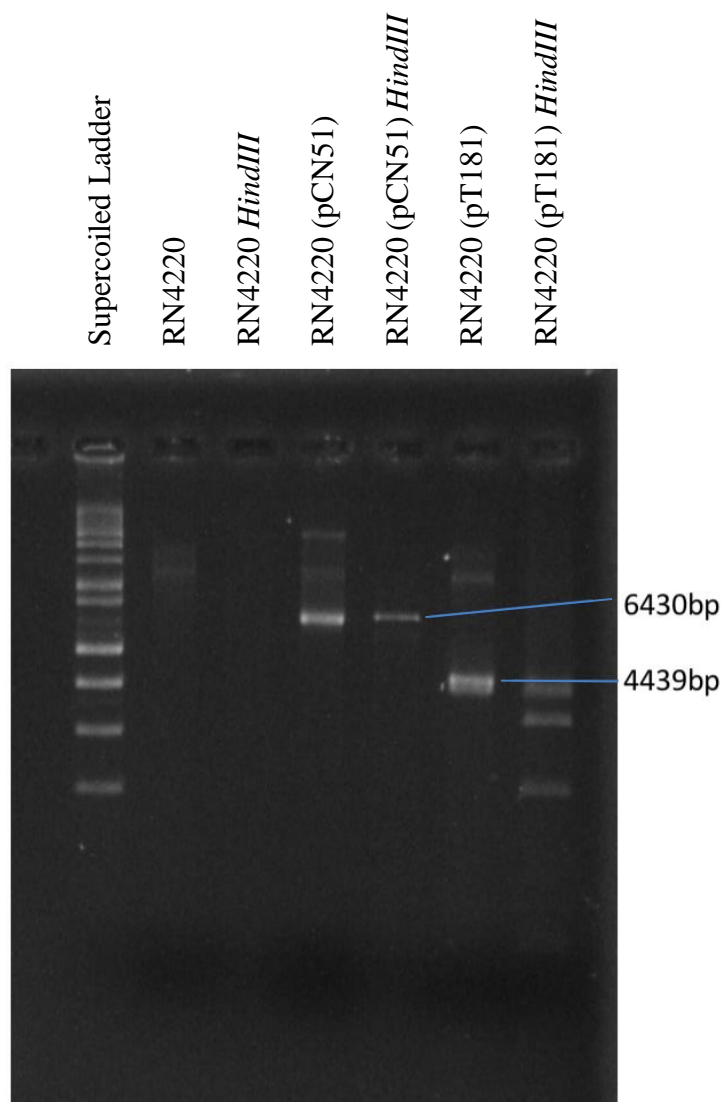
Jde o metodu založenou na náboji molekul. Nukleové kyseliny DNA jsou záporně nabitě a jelikož plazmidovou DNA umístíme do gelu na elektroforetické vaně, která má na jedné straně katodu a na druhé anodu, plazmidová DNA se bude pohybovat od vodiče s nábojem – k vodiči s nábojem +. Pro separaci molekul velikosti 100 bp – 50 kbp jsou vhodné agaróзовé gely.

Rychlost pohybu molekul DNA v gelu se označuje jako elektroforetická pohyblivost a je závislá na jejich velikosti. Čím větší bude molekula DNA, tím se bude pomaleji pohybovat k anodě. Pro zjištění velikosti molekuly DNA používáme tzv. velikostní standard, se kterým neznámou velikost porovnáváme. Standard bývá většinou složen z restrikčních fragmentů plazmidových molekul nebo genomu bakteriofágů, jejichž velikost známe. Po provedení elektroforézy si můžeme udělat jednoduchý graf (Obr. 10), který nám znázorní závislost rychlosti na velikosti molekuly DNA.

Obrázek 10: Graf závislosti rychlosti pohybu molekul DNA na její velikosti



Obrázek 11: Analýza plazmidů (pCN51), (pT181) s přidáním a bez přidání restrikčního enzymu *HindIII*



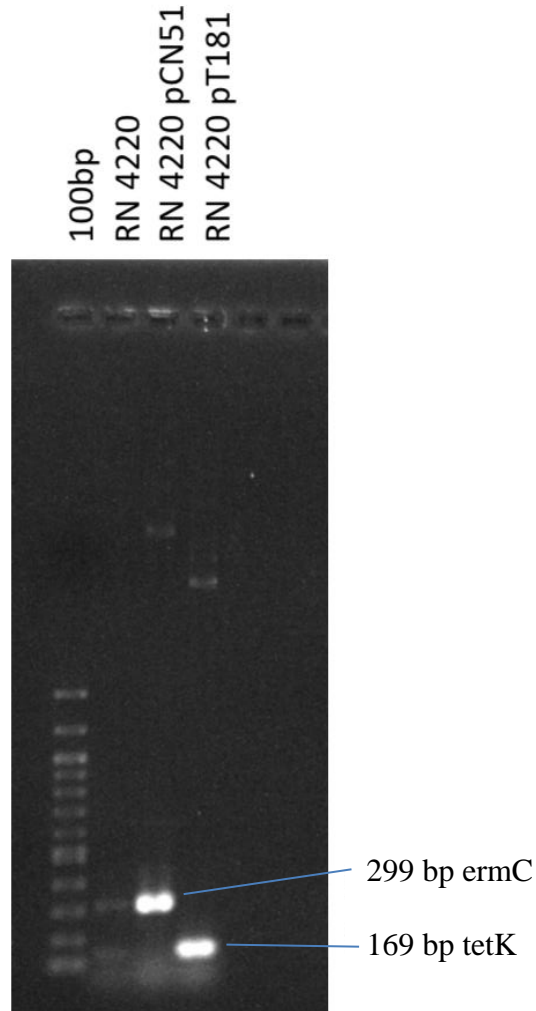
Pro porovnání velikostí byl použit hmotnostní standard Supercoiled Ladder. Velikost plazmidu (pCN51) je 6430 bp. Velikost plazmidu (pT181) je 4439 bp. Obě velikosti odpovídají tabulkovým hodnotám. Kmen RN4220 nemá na kolonce žádnou čárku, protože je bezplazmidový.

4.5 Detekce genů rezistence k antibiotikům

Fragmenty získané PCR detekujeme gelovou elektroforézou. U kmenů RN4220 (pCN51), RN4220 (pT181) se objevil na gelu proužek. To je důkazem, že u těchto kmenů informaci o rezistenci opravdu najdeme na plazmidu. Podle velikosti jsme zjistili, že se jedná o gen pro rezistenci k tetracyklinu – tetK, který měl velikost 169 bp a o gen pro rezistenci k erythromycinu – ermC, který měl velikost 299 bp. Bezplazmidový kmen RN4220 slouží opět

jako negativní kontrola. Neznatelně viditelné proužky u něj mohou být způsobeny přítomností zbytků DNA bakterie.

Obrázek 12: PCR pro geny tetK, ermC



Výsledky dokazují, že pokud jsou geny rezistence na plazmidech, mohou se snadno šířit do citlivých kmenů, jak prokazuje přenos plazmidů (pCN51) a (pT181) transdukci.

5 ZÁVĚR

Na bezplazmidovém kmenu *S. aureus* RN4220 nebyly nalezeny žádné geny rezistence k antibiotikům. Sloužil nám později jako kontrola. Tomu tak ale nebylo u ostatních kmenů *S. aureus*, které byly jeho transduktanty.

Transdukce je nejběžnějším mechanismem horizontálního přenosu genů, právě geny rezistence lokalizované na plazmidech se jím snadno šíří. Snadný přenos umožňují mobilní genetické elementy, do kterých se právě plazmid řadí.

Transdukce je zprostředkována bakteriofágem, který běžně přenáší pouze svoji genetickou informaci, může ale dojít k chybnému sbalení a do fágové hlavičky mohou být sbaleny úseky chromozomů, nebo mobilní genetické elementy nesoucí rezistenci. Bakteriofág poté může napadnout další bakteriální buňky a sbalenou DNA do nich vpravit. Tím vznikne rezistentní, nebo multirezistentní bakterie. Tato schopnost bakteriím umožňuje prostřednictvím bakteriofágů přenášet nejen rezistenci, ale i jiné geny, díky kterým se mohou snadno přizpůsobit změnám prostředí.

Velikost plazmidů byla stanovena pomocí restrikční analýzy. Byl použit štěpící enzym *HindIII*, kterým se podařilo rozštěpit všechny zkoumané vzorky. Velikosti plazmidů byly 6 430 bp a 4 439 bp.

Na dvou zkoumaných transduktantech – kmeny *S. aureus* RN4220 (pCN51) a RN4220 (pT181) byly pomocí PCR nalezeny geny rezistence. U kmene rezistentního k erythromycinu - RN4220 (pCN51) byl nalezen gen *ermC*, u kmene rezistentního k tetracyklinu - RN4220 (pT181) byl nalezen gen *tetK*. Oba kmeny byly rezistentní vždy k jednomu ze zkoumaných antibiotik. Měly právě jeden plazmid, na kterém byly detekovány odpovídající geny rezistence k těmto antibiotikům. Naopak u kmene MRSA E9 se můžeme domnívat, že obsahuje více plazmidů. Je totiž rezistentní k velké většině dnešních antibiotik – multirezistentní kmen.

Nabízí se tedy myšlenka, že počet genů rezistence k antibiotikům odpovídá počtu plazmidů v buňce, tato domněnka je ale chybná. Na jednom plazmidu se totiž může nacházet více genů rezistence. Práce ovšem ukázala, že rezistence k antibiotikům u stafylokoků je závislá na přítomnosti plazmidů, které nesou geny rezistence.

Rychlý vývoj bakteriální rezistence k antibiotikům je zapříčiněn především nadužíváním antibiotik nejen v lékařství, ale také ve veterinární praxi a v kosmetice. Čím dál tím častěji se setkáváme s multirezistentními kmeny. Pokud tyto kmeny nakazí jedince, často způsobí infekci končící smrtí.

6 POUŽITÁ LITERATURA

Biogen Praha s.r.o., molekulární biologie a genetika, *HindIII*, 2022. Dostupný na World Wide Web: <https://eshop.biogen.cz/hindiii>

Fišarová, L: Molekulární charakterizace plazmidů koaguláza-negativních stafylokoků, diplomová práce Masarykovy univerzity, 2015

Hulatová, N: Úloha bakteriofágů v horizontálním přenosu genu u stafylokoků, bakalářská práce Masarykovy univerzity, 2016

LabGuide průvodce laboratoří, restrikční štěpení, 2014-2019. Dostupný na World Wide Web: <https://labguide.cz/reagencie/enzymy/restrikcni-stepeni/>

Mikesková, S: Stanovení citlivosti k antibiotikům u vybraných bakteriálních kmenů diskovou difúzní metodou z pozitivních hemokultur ve zrychleném režimu, bakalářská práce Masarykovy univerzity, 2021

New England BioLabs Inc. Dostupný na World Wide Web: <https://international.neb.com/>

Snustad, DP, Simmons, MJ: Principles of Genetics, 7th ed., John Wiley and Sons, Inc., 2013. Kol. autorů: Genetika. Překlad z angl. Originálu, editorka českého vydání Relichová, J., druhé vydání, MU Brno, 2017

Šmarda, J: Metody molekulární biologie, Brno: Masarykova univerzita, 2005. ISBN 80-210-3841-1.

Vogan, A, Higgs, PG: The advantages and disadvantages of horizontal gene transfer and the emergence of first species, 2011

7 SEZNAM OBRÁZKŮ A TABULEK

Seznam obrázků

Obrázek 1: Přenos alely a^+ konjugací z donorové do recipientní buňky (Snustad a Simmons, 2016,173)	10
Obrázek 2: Přenos alely a^+ transformací z donorové do recipientní buňky (Snustad a Simmons, 2016,173)	10
Obrázek 3: Bakteriofág λ , který infikuje buňky <i>E. coli</i> (Snustad a Simmons, 2016,168)	11
Obrázek 4: Bakteriofág T4, který infikuje buňky <i>E. coli</i> (Snustad a Simmons, 2016,166)	11
Obrázek 5: Přenos alely a^+ transdukcí z donorové do recipientní buňky (Snustad a Simmons, 2016,173)	12
Obrázek 6: Stanovení rezistence kmene <i>S. aureus</i> RN 4220 k antibiotikům diskovou difúzní metodou	20
Obrázek 7: Stanovení rezistence kmene <i>S. aureus</i> RN 4220 (pCN51) k antibiotikům diskovou difúzní metodou	21
Obrázek 8: Stanovení rezistence kmene <i>S. aureus</i> RN 4220 (pT 181) k antibiotikům diskovou difúzní metodou	21
Obrázek 9: Stanovení rezistence kmene MRSA E9 k antibiotikům diskovou difúzní metodou	22
Obrázek 10: Graf závislosti rychlosti pohybu molekuly DNA na její velikosti	24
Obrázek 11: Analýza plazmidů (pCN51), (pT181) s přidáním a bez přidání restričního enzymu <i>HindIII</i>	25
Obrázek 12: PCR pro geny tetK, ermC	26

Seznam tabulek

Tabulka 1: Původ analyzovaných kmenů <i>S. aureus</i>	15
Tabulka 2: PCR primery využité pro detekci genů rezistence k antibiotikům	16
Tabulka 3: Složení roztoků A1, A2, A3, A4, které můžeme použít pro izolaci plazmidové DNA bez použití kitu.....	18
Tabulka 4: PCR směs pro celkový objem 25 μ l, 50 μ l a obecná koncentrace (New England BioLabs Inc.)	19
Tabulka 5: program PCR (New England BioLabs Inc.).....	19
Tabulka 6: Koncentrace izolované plazmidové DNA	23