

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

2. LÉKAŘSKÁ FAKULTA

Ústav lékařské mikrobiologie

Markéta Mošnicková

**Studium biofilmu *Pseudomonas aeruginosa*
a zavedení nových metod pro stanovení
citlivosti k antibiotikům**

bakalářská práce

Praha 2012

Autor práce: **Markéta Mošničková**

Vedoucí práce: **MVDr. Oto Melter, Ph.D.**

Oponent práce: **MUDr. Vanda Chrenková**

Datum obhajoby: **2012**

Bibliografický záznam

Mošnicková, Markéta. Studium biofilmu *Pseudomonas aeruginosa* a zavedení nových metod pro stanovení citlivosti k antibiotikům. Praha: Univerzita Karlova, 2. lékařská fakulta, 2012. 55 s. Vedoucí bakalářské práce MVDr. Oto Melter, Ph.D.

Anotace

Biofilm je komplexní struktura produkovaná bakteriemi, která je tvořena vysoce hydratovanou extracelulární vláknitou strukturou a je běžnou součástí světa kolem nás. Vyskytuje se jak v přírodě tak v antropogenně změněném prostředí. Například ve vodě se vyskytuje jako silně ulpívající slizovitá vrstva na kamenech a dalších pevných předmětech. Biofilm lze využít například při čištění odpadních vod a v procesech bioremediace. Tvorba biofilmu je však nežádoucí v medicíně. Tady biofilm tvořící bakterie nejdříve kolonizují povrchy katetrů, kloubních a jiných náhrad a tím tvoří zdroj chronické infekce, které znemožňují hojení nebo normální funkci náhrad. Produkce biofilmu je rovněž důvodem, proč infekce *P. aeruginosa* u pacientů s cystickou fibrózou přecházejí do chronického stádia. Tato etapa je charakterizovaná kultivačním průkazem kmene *P. aeruginosa* s mukózním fenotypem.

V bakalářské práci jsem analyzovala klinický materiál a kmen *P. aeruginosa*, který disocioval na mukózní a hladký fenotyp pomocí světelné, elektronové (TEM) a imunofluorescenční mikroskopie. Navrženo bylo originální zpracování bakteriální kultury zalité v agaróze pro TEM, které se však neosvědčilo. Světelná mikroskopie a imunofluorescence však umožnila prokázat biofilm ve sputu pacienta, ale i extracelulární materiál v bakteriální kultuře mukózního fenotypu. Izoláty byly identifikovány pomocí hmotnostní spektrometrie a klonální analýza obou izolátů byla provedena pomocí RAPD PCR, která potvrdila, že se jedná o stejný kmen. Citlivost disociované kultury *P. aeruginosa* k aminoglykosidům se vzájemně lišila. Paradoxně mukózní fenotyp 142M (M) byl na rozdíl od hladkého fenotypu 143S (S) citlivý. Rešerše k zavedení specializované metody pro stanovení citlivosti biofilmu k antibiotikům umožní jeho zavedení pro vyšetření kmenů *P. aeruginosa* od pacientů s CF s chronickou infekcí.

Klíčová slova

Biofilm, *Pseudomonas aeruginosa*, cystická fibróza, rezistence, mukózní fenotyp

Annotation

Biofilm is a complex structure produced by bacterial cells which contain highly hydrated filamentous exopolysaccharides. Biofilm exists everywhere in our surroundings or nature. It creates for instance a sticky viscous structure covering the surface of stones or other solid objects underwater. The technology of sewage cleaning remediation is essentially dependent on the presence and function of biofilm producing bacteria. Adhered biofilm in medicine has usually negative consequences for patient health, hence, reduction of its role is a goal of researches in the field. Here biofilm first of all adheres and colonizes catheters or artificial joints or other implants and is a source of a chronic infection which limits the healing process or normal function of the implants. In cystic fibrosis patient biofilm production is also responsible for the fact that acute infection caused by *P. aeruginosa* could change within a few months in chronic infection when mucoid strain could be cultivated from the patient.

In my bachelor thesis I have analyzed clinical material and bacterial isolate of *P. aeruginosa* of a cystic fibrosis patient which dissociated into mucoid and smooth phenotype using light-, electron- and immunofluorescence microscopy. I have applied an original method using resuspended bacterial culture in solid agarose to process samples for electron microscopy which was finally not suitable for the microscopy. Biofilm in patient sputa and also extracellular substances from mucoid bacterial culture of *P. aeruginosa* could be proved using light microscopy and immunofluorescent microscopy. Smooth and mucoid isolates from the patient were identified by mass spectrometry as *P. aeruginosa*. Clonal analysis of the isolates confirmed that the isolates belong to one strain. The isolates differed in susceptibility to aminoglycosides. Paradoxically, the mucoid isolate 143M (M) was susceptible compared to resistant smooth isolate 142S (S). Literature review of biofilm susceptibility assay will be a source of essential information which can be used for introducing the special method for susceptibility testing of *P. aeruginosa* biofilm in chronically infected CF patients.

Keywords

Biofilm, *Pseudomonas aeruginosa*, cystic fibrosis, resistance, mucoid phenotype

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci zpracovala samostatně pod vedením MVDr. Oto Melter, Ph.D., uvedla všechny použité literární a odborné zdroje a dodržovala zásady vědecké etiky. Dále prohlašuji, že stejná práce nebyla použita pro k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze 19.4.2012

Markéta Mošničková

Poděkování

Ráda bych poděkovala svému školiteli MVDr. Otovi Melterovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné konzultace a trpělivost při zpracování této práce. Dále děkuji MUDr. Jiřímu Uhlíkovi, Ph.D. za pomoc a cenné rady při zpracování vzorků pro elektronovou mikroskopii. V neposlední řadě děkuji své rodině za podporu při mém studiu.

Obsah

1. SEZNAM ZKRATEK	9
2. ÚVOD	10
3. BIOFILM	11
3.1. Struktura biofilmu	12
3.2. Vznik a funkce biofilmu	13
3.3. Biofilm u pacientů s cystickou fibrózou	16
3.4. Citlivost biofilmu k antibiotikům	17
4. INFEKCE PSEUDOMONAS AERUGINOSA U PACIENTŮ S CYSTICKOU FIBRÓZOU A TVORBA BIOFILMU	22
4.1. Identifikace a klonální analýza	24
4.2. Biologické vlastnosti	25
4.3. Výskyt	25
5. CÍL	26
6. MATERIÁL	26
6.1. Kontrolní kmeny	26
6.2. Analyzované klinické izoláty	26
6.3. Kultivační média a diagnostické soupravy	26
6.4. Materiál pro molekulárně biologickou analýzu	27
6.4.1. Roztoky	27
6.4.2. Primery, reagentie pro PCR	27
7. METODY	27
7.1. Odběr klinického materiálu	27
7.2. Mikroskopie sputa a bakteriálních kultur	27

[Zadejte text.]

7.2.1. Světelná mikroskopie	28
7.2.2. Elektronová mikroskopie	28
7.2.3. Imunofluorescenční mikroskopie	33
7.3. Kultivační průkaz <i>P. aeruginosa</i> s různým morfolotypem	34
7.3.1. Fenotypová identifikace	34
7.3.2. Klonální analýza	34
7.4. Stanovení citlivosti k antibiotikům	35
7.4.1. Stanovení citlivosti k antibiotikům diskovou difuzní metodou	37
7.4.2. Stanovení minimální inhibiční koncentrace antibiotik (MIC)	38
7.4.3. Stanovení baktericidní inhibiční koncentrace biofilmu k antibiotikům (BIC)	40
8. VÝSLEDKY	42
8.1. Mikroskopie sputa a bakteriálních kultur	42
8.1.1. Světelná mikroskopie	42
8.1.2. Elektronová mikroskopie	45
8.1.3. Imunofluorescenční mikroskopie	46
8.2. Kultivační průkaz <i>P. aeruginosa</i> s různým morfolotypem	47
8.2.1. Fenotypová identifikace	47
8.2.2. Klonální analýza	48
8.3. Stanovení citlivosti k antibiotikům	48
8.3.1. Stanovení citlivosti k antibiotikům diskovou difuzní metodou	48
8.3.2. Stanovení minimální inhibiční koncentrace antibiotik (MIC)	49
9. DISKUZE.....	51
10. ZÁVĚR.....	53
11. REFERENČNÍ SEZNAM.....	54

[Zadejte text.]

1 Seznam zkratek

EPS	<i>extracellular polymeric substances</i> , extracelulární polymerní látky
MDR systém	<i>multi- drug resistance system</i>
CF	cystická fibrosa
MIC	minimální inhibiční koncentrace
BIC	baktericidní inhibiční koncentrace biofilmu k antibiotikům
ATP	adenosin trifosfát
ATB	antibiotika
MH bujón	Mueller-Hintonův bujón
MH	Mueller-Hintonův agar
DD metoda	disková difuzní metoda
CFTR	<i>cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene</i>
QS	<i>quorum sensing</i>
S	<i>smooth</i> - hladký fenotyp
M	<i>mucoïd</i> - mukózní fenotyp
PCR	polymerázová řetězová reakce
RAPD	<i>random amplification of polymorphic DNA</i>
TEM	transmisní elektronový mikroskop
SEM	skenovací (rastrovací) elektronová mikroskopie
UA	uranylacetát
CFU	<i>colony forming units</i>
CAMHB	<i>cation-adjusted Mueller-Hinton broth</i>

2 Úvod

Téma své bakalářské práce „Studium biofilmu *Pseudomonas aeruginosa* a zavedení nových metod pro stanovení citlivosti k antibiotikům“ jsem si vybrala pro svůj zájem o tuto problematiku. Na výskyt biofilmu neexistuje jednotný pohled, názorů na jeho „užitečnost“ či „škodlivost“ je mnoho a mnohdy nejsou zcela jednoznačné. V přírodním prostředí poskytuje biofilm životní prostor pro mnoho různých organismů, ať už se jedná o bakterie, prvoky nebo larvy hmyzu. Jeho vlastnosti jsou hojně využívány člověkem například k čištění odpadních vod, kdy biofilm napomáhá degradaci dusíkatých látek. V některých odvětvích lidské činnosti je však výskyt biofilmu nežádoucí jako například v medicíně, kde je výskyt a tvorba biofilmu předmětem mnoha studií a je vyvíjeno značné úsilí k zamezení tvorby biofilmu. Nejčastěji je tady problematika tvorby biofilmu spojována s pacienty trpícími imunodeficiencí nebo s tvorbou biofilmů na katetrech či kloubních náhradách.

Mezi nejznámější producenty biofilmů a původce infekcí s biofilmem asociovaných patří *P. aeruginosa*, jejíž výskyt se bedlivě sleduje hlavně u pacientů s CF. Diagnostika infekcí *P. aeruginosa* u pacientů s CF hraje významnou roli pro zvolení vhodné antimikrobiální léčby. Kmeny *P. aeruginosa* v průběhu infekce mohou produkovat biofilm, který vzniká jako odpověď na neustálé změny podmínek v dýchacích cestách. Tyto změny jako je např. změna pH a účinek peroxidů fagocytárního původu v kombinaci s působením antibiotik působí jako stresové faktory vedoucí k produkci biofilmu. Průkaz infekce *P. aeruginosa* u pacientů s CF provázená tvorbou biofilmu, který *in vitro* odpovídá průkazu mukózního kmene, má horší prognózu a znamená chronickou infekci, která se těžko ovlivňuje léčbou antibiotiky.

V současné době se vynakládá značné úsilí ke studiu a pochopení mechanismů tvorby biofilmu a vzniku antimikrobiální rezistence biofilmu. Četné studie v současnosti analyzují procesy podmiňující vznik a fungování biofilmu. Současně s novými poznatky dochází také k inovaci stávajících a vývoji nových metod, kterými lze stanovit citlivosti kmenů *P. aeruginosa* k antimikrobiálním látkám.

3 Biofilm

Biofilm je nedílnou součástí světa kolem nás. Jistě každý se s ním již někdy setkal. Ať už to bylo v létě na říčních kamenech, kde biofilm vytváří slizovité nárosty nebo ve formě železitých inkrustací ve vodovodním potrubí. Tvorba biofilmu byla zaznamenána prakticky ve všech oblastech lidské činnosti. Biofilmy se tvoří v přírodním prostředí ale i v prostředí, které je změněno lidskou činností (antropogenní), kde jejich přítomnost není žádoucí. Biofilm obvykle pevně ulpívá na površích a zásadním způsobem může měnit jejich vlastnosti.

V mnoha odvětvích průmyslu, jako je biotechnologie, čištění odpadních vod nebo bioremediace, je naopak přítomnost biofilmů nezbytná. Díky přítomnosti biofilmu ve filtrech čističek odpadních vod je možné tyto znečištěné vody zbavovat dusíkatých látek. Biofilmový systém využívá kombinaci aerobního procesu nitrifikace amoniaku a anaerobního procesu denitrifikace neboli redukce vzniklého dusičnanu na dusík k přeměně dusíkatých látek obsažených v odpadních vodách na plynný dusík [6, s 236].

Zcela samostatnou, ale nesmírně důležitou a v současnosti nejvíce studovanou otázkou je výskyt biofilmů v medicíně, především na cizích tělesech v lidském těle, jako jsou kanyly, katetry či plastové protetické implantáty, kde biofilm je trvalým zdrojem chronických a rekurentních infekcí.

Studiem biofilmů se zabývá mnoho odvětví, liší se však zaměřením i polem působnosti jednotlivých výzkumů. Existují různé pohledy na „škodlivost“ či „užitečnost“ biofilmů. V biomedicíně je biofilm nežádoucí a tudíž je snaha omezit jeho tvorbu nebo jej zcela eliminovat. K jeho studiu se využívají multidisciplinární přístupy a metody, proto bývá někdy obtížné porovnat výsledky z těchto studií. Tento fakt může být příčinou nejednotnosti definice biofilmu.

Jedna z definic, používaná mezi biology označuje biofilm jako: „...aktivní biologická vrstva složená z mikroorganismů (bakterií, řas, hub, prvoků, mnohobuněčných) a jejich extracelulárních polymerních produktů, která je přichycena na povrchu nejrůznějších podkladů, které jsou v kontaktu s vodou...“ [6, s. 13].

Definice biofilmu se rovněž v závislosti na probíhajících výzkumech stále mění. Jedna z nejaktuálnějších definic, která zahrnuje i fyziologické vlastnosti organismů žijících v biofilmu a schopnost transkripce genů, říká, že biofilm je: „...přisedlé společenstvo mikroorganismů, charakterizované tím, že buňky, které jsou ireverzibilně

[Zadejte text.]

přichycené k podkladu nebo jedna k druhé, jsou zapuštěné v matrici extracelulárních polymerních látek těmito buňkami produkovaných, které dále vykazují odlišný fenotyp s ohledem na rychlost růstu a transkripci genů.” [6, s. 13]; [6, s. 11-13]; [1, s. 61-62].

3.1 Struktura biofilmu

Biofilm je primárně tvořen přisedlými koloniemi mikroorganismů a jejich extracelulárními produkty (*EPS= extracellular polymeric substancis*). Polymerní produkty vytvářejí základní matrici. Paralelou pro biofilm *in vivo* jsou mukózní bakteriální kolonie *in vitro*. Mukózní kmeny *P. aeruginosa* produkují velké množství exopolysacharidu (alginátu), který dodává koloniím hlenovitý vzhled. Alginát patří mezi komponenty EPS, které si zaslouží zvláštní pozornost. Jde o nejlépe známý komponent biofilmu mukózních kmenů *P. aeruginosa*. Alginát je chemicky lineární kopolymer kyseliny β -D-manuronové a α -L-guluronové. Jeho tvorba není pro vznik biofilmu nezbytná a jeho absence nijak neovlivňuje jeho strukturu. Produkce alginátu je považována za jeden z faktorů virulence. Infekce u pacientů s CF způsobené kmeny *P. aeruginosa*, které produkují alginát, mají těžší průběh než u kmenů, které alginát neprodukují [6, s. 101]; [5]; [4, s. 7945].

Polysacharidová matrice má pavučinovitou strukturu, která nabízí dostatečnou mechanickou stabilitu pro udržení prostorového uspořádání biofilmu. Tato matrix interaguje s prostředím například tím, že přichytí biofilm k povrchu a díky svým sorpčním vlastnostem, které umožňují izolaci rozpuštěných látek a částic substancí z okolí, poskytuje živiny pro buňky biofilmu [4, s. 7945].

Mezi EPS patří i další látky, celá řada bílkovin, glykoproteinů, glykolipidů a v některých případech i překvapivé množství extracelulární DNA (eDNA). Biofilm dále obsahuje látky, které patří do systému „*quorum sensing*“ (QS), který je způsobem vnitrobiofilmové, mezibuněčné bakteriální komunikace. Základem je produkce signálních látek (tzv. autoinduktorů). Koncentrace signálních látek stoupá se zvyšující se hustotou populace a dochází k hromadění vysokých koncentrací těchto látek v buňkách i v jejich okolí. V době kdy dojde k překročení prahové koncentrace signálních molekul, se signální molekula naváže na membránový receptor na povrchu bakteriální buňky a poté se aktivuje intracelulární regulátorový protein. Ten spouští fosforylační kaskádu, která vede k expresi celé řady genů, které ovlivňují třeba regulaci exprese faktorů virulence a podílí se na regulaci tvorby biofilmu [6, s. 31-33].

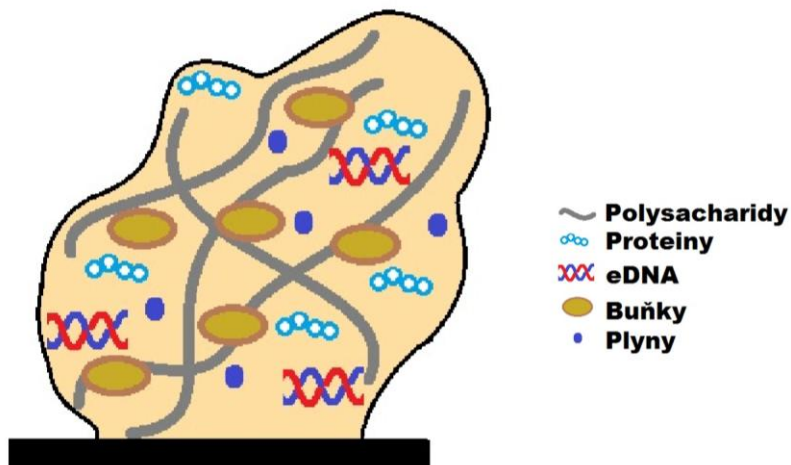
[Zadejte text.]

Autoinduktory lze také prokázat na místě, odkud byl biofilm odstraněn. Tyto látky mohou ukazovat na výskyt biofilmu v určitých místech a jejich detekce může prokázat přítomnost biofilmu [6, s. 31].

Struktura biofilmu není homogenní, obsahuje soustavu četných kanálů a dutin, které slouží k cirkulaci vody, přísunu živin a kyslíku. Jsou to spletené, vzájemně komunikující kanálky rozmanitého tvaru, které zásobují látkami a plyny bakterie žijící v biofilmu. Bakterie tvoří v biofilmu shluky buněk, takzvané mikrokolonie. Architektura biofilmu je různorodá, neustále se mění v prostoru a čase v důsledku vnějších a vnitřních procesů [2]; [4, s. 7946]; [6, s. 11]; [1, s. 61-63]; [8, s. 30- 32].

EPS jsou také vysoce hydratované, protože dokáží začlenit velké množství vody do svých struktur pomocí vazby vodíku. Je známo, že produkce EPS a s tím i související tloušťka biofilmu je ovlivněna dostupností živin a minerálních látek v živném médiu [1, s. 63]; [2]. Naměřené hodnoty tloušťky biofilmu kolísají od několika až po téměř stovky mikrometrů [1, s. 63].

Je známo, že produkce EPS a s tím i související tloušťka biofilmu závisí na dostupnosti živin a na tom, zda je biofilm složen z jednoho či více bakteriálních druhů. V přirozeném prostředí je společenství několika druhů obvyklejší.



Obrázek 1: Složení biofilmu: Biofilm je primárně tvořen buňkami a jejich extracelulárními produkty (EPS).

3.2 Vznik a funkce biofilmu

Podmínkou vzniku biofilmu je, aby se volně plovoucí planktonické buňky přichytily k povrchu. Děje se tak za pomoci specifických adhezínů na povrchu

[Zadejte text.]

mikrobiální buňky, které se váží na receptorové molekuly hostitelských buněk nebo k vhodnému povrchu.

Vlastnosti biofilmu jsou silně závislé na typu povrchu, který bakterie kolonizují a na převládajících fyzikálně-chemických podmínkách prostředí. Proto jsou značné rozdíly ve fyziologických vlastnostech, organizaci a metabolismu buněk mezi biofilmy, které se tvoří například uvnitř potrubí, implantátech v lidském těle, říčních či mořských sedimentech, měkkých rostlinných a živočišných tkáních. Povrchy na kterých se biofilmy mohou vytvářet lze rozdělit na 3 typy (Obrázek 2) [6, s. 17-19]:

A. Rozhraní pevné a vzdušné fáze (*Solid/ air interference*)

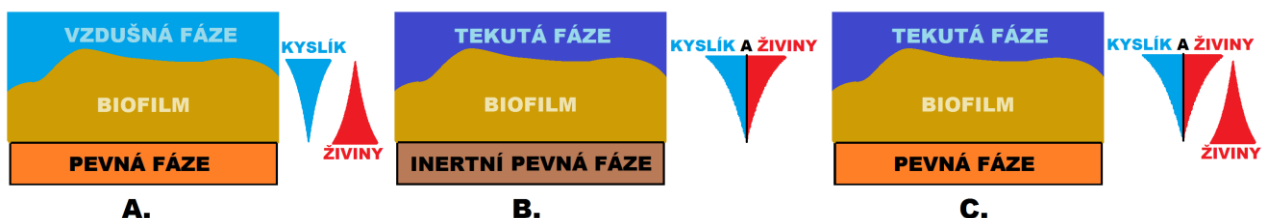
Tento povrch se nachází například v plicích a uplatňuje se při rozvoji plicní infekce. Biofilm získává živiny a vlhkost z pevné fáze a kyslík z fáze vzdušné. Výsledkem je vznik opačných gradientů živin a kyslíku (Obrázek 2A).

B. Rozhraní inertní pevné a tekuté fáze (*Inert solid/ liquid interfaces*)

Tento povrch nalezneme například v potrubích, kloubních implantátech, katetrech. Živiny a kyslík jsou získávány z tekutého prostředí, jejich gradient s rostoucí hloubkou biofilmu klesá (Obrázek 2B).

C. Rozhraní pevné a tekuté fáze (*Solid nutrient/liquid interfaces*)

Tento povrch se uplatňuje například u infekcí měkkých tkání, v půdním prostředí. Živiny a kyslík jsou získávány jak z pevné tak i z tekuté fáze. Výsledkem je vznik rozmanitých chemicko-fyzikálních gradientů uvnitř biofilmu (Obrázek 2C) [6, s. 19].



Obrázek 2: Znázornění 3 typů povrchů, na kterých se tvoří biofilm a znázornění gradientů živin a kyslíku v biofilmu [6, s. 19].

[Zadejte text.]

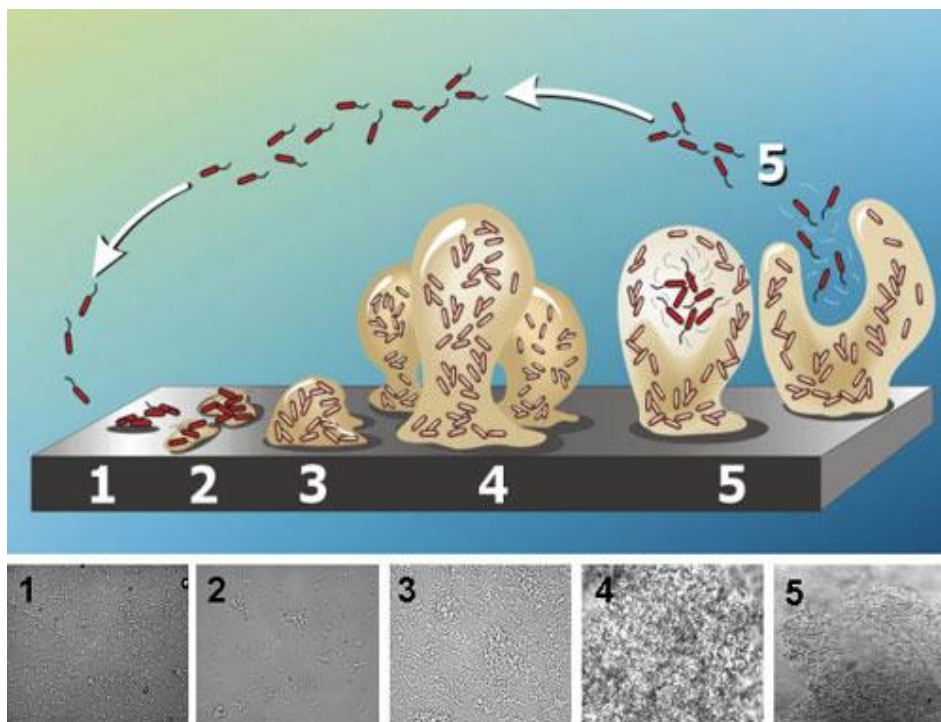
Těsně před adhezí bakterií k povrchu se spouští řada genů nebo se jejich aktivita dramaticky zvyšuje. Rovněž bičíky se podílejí na adhezi, kdy při kontaktu s povrchem se jejich tvorba zvyšuje. V biofilmu se naopak jejich tvorba snižuje, až úplně ustane [1, s. 65-66]; [6, s. 17-18].

Po přichycení se buňky začnou dělit, zároveň změní své chování a fenotyp. Nejprve změní vlastnosti na úrovni regulace genů. U buněk biofilmu dochází asi u třetiny bílkovin ke změně poměrů produkce oproti planktonicky žijícím buňkám. Po přisednutí buněk k povrchu se začíná produkovat velké množství EPS, tím vzniká **primární biofilm**. Na primární biofilm se mohou přichycovat i další buňky a tím vzniká **sekundární biofilm**. Buňky v primárním biofilmu rostou pomaleji než například buňky sekundárního biofilmu či buňky planktonické. Prodloužená doba růstu je pravděpodobně spojená s adaptací na podmínky přisedlého růstu či fenotypovými změnami buněk biofilmu. Toto zpoždění v růstu buněk primárního biofilmu se nazývá „*surface associated lag time*“ [6, s. 18]; [1, s. 66].

V biofilmu se buňky množí a vytváří tak mikrokolonie. Na určitý impulz se mohou jednotlivé buňky či celé mikrokolonie z biofilmu uvolňovat a znovu přecházet do planktonického stavu (Obrázek 3/5). Tyto buňky jsou primárně zodpovědné za manifestaci onemocnění, protože vyvolávají imunitní odpověď hostitele. Volné planktonické buňky odplouvají a mohou tak kolonizovat další povrchy (Obrázek 3/1). Můžeme tedy říct, že jednou z funkcí biofilmu je „zásobárna“ mikroorganismů. Vyzrálá vrstva biofilmu také tvoří bariéru, která chrání buňky v něm rostoucí proti vnějším vlivům, jako jsou například desinfekční látky, antibiotika, ochranné mechanismy hostitele. Buňky biofilmu jsou až tisíckrát více rezistentní k antibiotikům než buňky planktonické. Jako jedno z vysvětlení této zvýšené rezistence může být snížení difuze antibiotika skrz hustý biofilm. I přes sníženou difuzi antibiotik do biofilmu po delší době pronikne. Některá antibiotika se však mohou navázat na polysacharid matrice biofilmu a tím ztratit svou aktivitu nebo být inaktivována enzymaticky [8, s. 34]; [1, s. 65]; [6, s. 176].

[Zadejte text.]

Alginát, který je součástí biofilmu, brání *P. aeruginosa* před fagocytózou neutrofilů i makrofágy vychytává a odstraňuje reaktivní radikály kyslíku a chlornan. Také brání účinné opsonizaci *P. aeruginosa*, pravděpodobně tím, že zahaluje její povrch a tak ji chrání před kontaktem s protilátkami a komplementem. Ačkoli je alginát pro makroorganismus látka cizorodá, nepřitahuje leukocyty, naopak dochází k inhibici jejich chemotaxe. Alginát ve vysokých dávkách, které jsou v plicích přítomné, potlačuje oxidativní vzplanutí uvnitř fagocytů, proto buňky rostoucí v biofilmu vyvolávají u neutrofilů menší oxidativní vzplanutí než buňky planktonické [6, s. 101].



Obrázek 3: Vznik a vývoj biofilmu - adheze buněk na povrch (3/1) a následná tvorba extracelulárních látek (3/2). Postupně dochází ke zpomalení růstu, změně chování buněk a zrání biofilmu (3/3; 3/4). Některé buňky mohou opět přecházet do planktonického stavu (3/5) a tak kolonizovat další povrchy (3/1) [13].

3.3 Biofilm u pacientů s cystickou fibrózou

Důkaz, že v plicích se při cystické fibróze vyskytuje bakteriální biofilm, potvrdila přítomnost dvou různých L-homoserinlaktónů, což jsou signály pro QS typické pro *P. aeruginosa*, a to ve stejném poměru jako v pseudomonádovém biofilmu [6, s. 102]. U zdravých lidí jsou planktonické buňky, které byly vdechnuty odstraněny z plic a trachey

[Zadejte text.]

během 20 minut. Zdravá plíce si umí špatně poradit s bakteriemi či kvasinkami, které se do dolních částí dýchacího traktu dostaly jako součást fragmentů biofilmu. Jejich odstranění je obtížné a v plicích mohou přetrvávat několik týdnů až měsíců. U plic pacientů postižených cystickou fibrózou vše navíc komplikuje vazký hlen a špatná pohyblivost řasinkového epitelu [6, s. 103].

3.4 Citlivost biofilmu k antibiotikům

Bakterie rostoucí v biofilmu jsou mnohem odolnější vůči antibiotikům a desinfekčním prostředkům než planktonicky rostoucí buňky stejného izolátu. Rezistence biofilmu také závisí na jeho stáří. Uvádí se, že 7 dní staré biofilmy mohou mít 100-1000 krát vyšší hodnoty MIC a MBC než mladé, 1 den staré biofilmy téhož izolátu [3, s. 26]. Vzhledem k vysoké rezistenci biofilmu k antimikrobiálním látkám, je léčení biofilmových infekcí velmi obtížné. V případě biofilmové infekce cizích těles a implantátů je jedinou možností léčby vyjmutí infikovaného implantátu. Což přináší další zátěž a rizika pro pacienta [6, s. 175-176]. Mechanismus biofilmové rezistence není dosud zcela objasněn a je stále předmětem zkoumání [6, s. 176]. Mechanismy buněčné rezistence lze rozdělit na fenotypovou adaptaci, která se projevuje přizpůsobením se bakterie na změněné metabolické pochody nebo změnu geneticky podmíněnou. Ke genetické modifikaci může dojít modifikací genu na chromozomu nebo převzetím genetického materiálu například plazmidů od rezistentních buněk [6 s. 190].

Odolnost bakterií tvořících biofilm vůči antibiotikům (např. aminoglykosidy, β -laktamová antibiotika, fluorochinolony) může být způsobena mnoha mechanismy, které vedou k zvýšení rezistence buněk biofilmu. Mezi nejvýznamnější a nejvíce prostudované mechanismy rezistence biofilmu k antibiotikům patří:

A. Zpomalený či žádný průnik antibiotika do biofilmu

Biofilm vytváří fyzikální a chemickou bariéru, která brání buňky v něm žijící, ať už se jedná o antimikrobiální látky nebo velké molekuly imunitního systému hostitele jako jsou například antimikrobiální proteiny - lysozomy a komplement. Biofilmová vrstva může difuzi látek zabraňovat dvěma způsoby.

Může fungovat jako „síto“, exopolysacharidová matrice tvoří počáteční bariéru, která zpomalí průnik určitých sloučenin antimikrobiálních látek, což může poskytnout

[Zadejte text.]

více času pro enzymovou degradaci těchto látek. Není však schopna jejich proniknutí zcela zabránit.

Biofilm může také určité látky vázat na základě fyzikálních interakcí či s nimi chemicky reagovat. S využitím exopolysacharidů lze snížit citlivost k mnoha antimikrobiálním látkám. U biofilmu *P. aeruginosa* již 2% suspenze alginátu inhibuje difúzi gentamicinu a tobramycinu. Tento efekt může být zvrácen použitím alginát lyázy. Negativně nabitý exopolysacharid je účinnou ochranou buněk před pozitivně nabitými aminoglykosidy. Bylo zjištěno, že rychlost difuze antibiotik přes alginátový gel je rychlejší u β -laktamových antibiotik než právě u aminoglykosidů. Difuze aminoglykosidů se zrychlí po počáteční 80- 100 minutové prodlevě. Tato prodleva se vysvětluje jako čas nutný k nasycení volných vazebných míst biofilmu [3]; [6, s. 177-188].

B. Rezistentní fenotyp– existence rezistentních buněk- perzistorů

I když je existence perzistorů velmi dobře popsána, není zatím zcela jasné, jaký je přesný mechanismus perzistence. Nejedná se na příklad o mutanty ani o buňky ve speciální fázi buněčného cyklu. Víme, že jsou to buňky vyskytující se v buněčné populaci, vykazují vyšší rezistenci vůči antimikrobiálním látkám než ostatní buňky téže populace. Perzistory nalezneme jak v planktonické populaci, tak v populaci buněk biofilmu, počet perzistorů v planktonické populaci je však několikařádově nižší než v biofilmu. V planktonické populaci buněk lze nalézt 0,001 % perzistentních buněk, které jsou schopné přežít při koncentraci antibiotika inhibující růst ostatních buněk v populaci. V kultuře planktonických buněk ve stacionární fázi je perzistorů více (cca 1%). V biofilmu se počet perzistorů odhaduje na 0,1%, což je méně než u planktonických buněk ve stacionární fázi, což je zapříčiněno metabolickou aktivitou buněk. Buňky ve stacionární fázi nerostou, zatím co buňky biofilmu rostou i když jen velmi pomalu. Tvorba perzistorů je závislá na stupni metabolické aktivity, to znamená, že s nižší rychlostí množení stoupá v populaci frekvence perzistorů [6, s. 184-185].

C. Aktivace univerzální odpovědi na stres (*general stress response*)

Bakterie odpovídají na stres, který může být způsoben nedostatkem živin, vysokou hustotou buněk, změnou pH, tepelným šokem, vlivem chemických látek a jinými druhy environmentálního stresu produkcí faktorů, které regulují transkripci určitých genů, jejichž produkty zmírňují účinky stresu. Syntézou těchto produktů bakterie odpovídají

[Zadejte text.]

na působení stresových faktorů z okolí. Což má za následek aktivaci mechanismu *univerzální odpovědi na působení stresových faktorů*. Tento mechanismus je založen na změně permeability buněčné membrány a expresi proteinu opravující nebo preventující následky působení stresu na komponenty bakteriální buňky [6, s. 182].

Zpomalený růst v buňce nemusí být způsoben pouze nedostatkem živin, ale může být způsoben i univerzální odpovědí na stres, kterou vyvolává růst v biofilmu. Odpověď organismu na stres vede k určitým fyziologickým změnám, které mají chránit buňku před jakýmkoli stresem z vnějšího prostředí [6, s. 183].

D. Snížená rychlost růstu buněk v biofilmu.

Pokud buňky v kultuře strádají, jejich růst se zpomalí. Tento přechod k pomalému růstu je doprovázen zvýšením rezistence k antibiotikům.

Pomalý růst buněk je ochranou před účinky antibiotik. Citlivost planktonických i biofilmových forem k ciprofloxacinu se zvyšuje s rostoucí rychlostí růstu. Pokud je růstová rychlost planktonických buněk i buněk biofilmu nízká, jsou buňky stejně rezistentní k ciprofloxacinu. Pokud se však rychlost růstu v obou kulturách zvýší, buňky biofilmu jsou více rezistentní oproti buňkám planktonickým [6, s. 180].

Mnohé studie prokázaly, že zpomalený růst nemá vliv na citlivost vůči všem antimikrobiálním látkám. Zpomalený růst *P. aeuruginosa* má vliv na citlivost k tetracyklinům, ale na citlivost k tobramycinu vliv nemá [6, s. 181].

E. Změna mikroprostředí

Ve vyzrálých biofilmech je vytvořena komplexní trojrozměrná struktura s mnoha odlišnými typy mikroprostředí. V těchto mikroprostředích panují odlišné podmínky, mohou se lišit například rozdílnou osmolaritou, přísunem živin a buněčnou hustotou. Díky této heterogenitě prostředí, můžeme v biofilmu v rámci jedné populace pozorovat buňky s mnoha odlišnými projevy jejich fenotypu [6, s. 181]. Odpověď jednotlivých buněk biofilmu na působení antibiotik se výrazně liší v závislosti na pozici buňky uvnitř biofilmu. Tento fakt by měl být brán v úvahu i při léčbě biofilmových infekcí [6, s. 180-182]. V mikroprostředích s nedostatkem živin či přebytkem odpadních produktů a jiných metabolitů, může být účinek antibiotika antagonizován. Stejně tak v těchto prostředích dochází ke zpomalení růstu bakterií, a tím může dojít ke snížení účinku antibiotik, která působí na rychle rostoucí buňky [6, s. 177].

[Zadejte text.]

F. Impermeabilita buněčné stěny a použití aktivních pump

Dalším z mechanismů rezistence, jsou tzv. širokospektré odtokové pumpy (*multidrug efflux pumps*). Ty mohou z buňky vyloučit i chemicky nepříbuzné antimikrobiální látky, jejich účast na rezistenci k antimikrobiálním látkám zatím zcela potvrzena nebyla. U *P. aeruginosa* jsou dosud známé tři druhy MDR pump a u dalších několika systémů, kódovaných v genomu *P. aeruginosa*, se jejich funkce předpokládá [6, s. 190]; [6, s. 180-182]. U jedné z těchto pump (MexAB-OprM) byl prokázán význam v biofilmové rezistenci k ofloxacinu. Bylo prokázáno, že biofilmy bez této MDR pumpy byly citlivější k nízkým koncentracím ofloxacinu [6, s. 187]. Zatím není zcela jasné, jakou roli hrají MDR pumpy v biofilmové rezistenci [6, s. 191].

G. Snížení permeability membrán

Další mechanismus rezistence, který může být indukován biofilmovými buňkami, je snížení permeability membrán. Jedná se o odpověď na působení antimikrobiálních látek. Ke změně permeability membrán dojde změnou membránových proteinů či jejich složení [6, s. 188]. Většina antibiotik působí na metabolické pochody tím, že se vážou na proteiny bakteriální buňky a jsou do buňky aktivně transportována pomocí buněčných přenašečů.

Aktivní transport je energeticky velice náročný proces, proto ho lze omezit snížením produkce ATP. „Impermeabilita buněčné stěny se uplatňuje např. u aminoglykosidů, tetracyklinů či chinolonů.“ [6, s. 191].

H. Enzymatická inaktivace cílové bakteriální struktury

Ke vzniku rezistence dochází, když buňka změní cílovou molekulu, a tím znemožní navázání antibiotika. Tento mechanismus rezistence je známý např. u rezistence na makrolidy, linkosamidy, ale i β -laktamy [6, s. 191].

I. Enzymatická inaktivace - štěpení molekuly ATB

Enzymatická inaktivace je nejobvyklejším mechanismem přenosné rezistence. Rezistentní kmeny produkují enzymy, které buď štěpí molekuly antibiotika a činí je neúčinnými nebo antibiotika substituují a obsazují jim vazebná místa na cílových molekulách. Patří sem enzymy rozkládající β -laktamy - různé β -laktamázy (penicilinázy, cefalosporinázy, karbapenemázy aj.) [6, s. 191].

[Zadejte text.]

J. Enzymatická modifikace molekuly ATB

P. aeruginosa produkuje enzymy, které mohou modifikovat molekuly antibiotik a tím inhibovat jejich účinek. Patří sem například enzymy modifikující aminoglykosidy - např. N-acetyl- transferázy, O-fosfotransferázy, O-nukleotidyltransferázy apod [6, s. 191].

K. Enzymatická substituce molekuly ATB

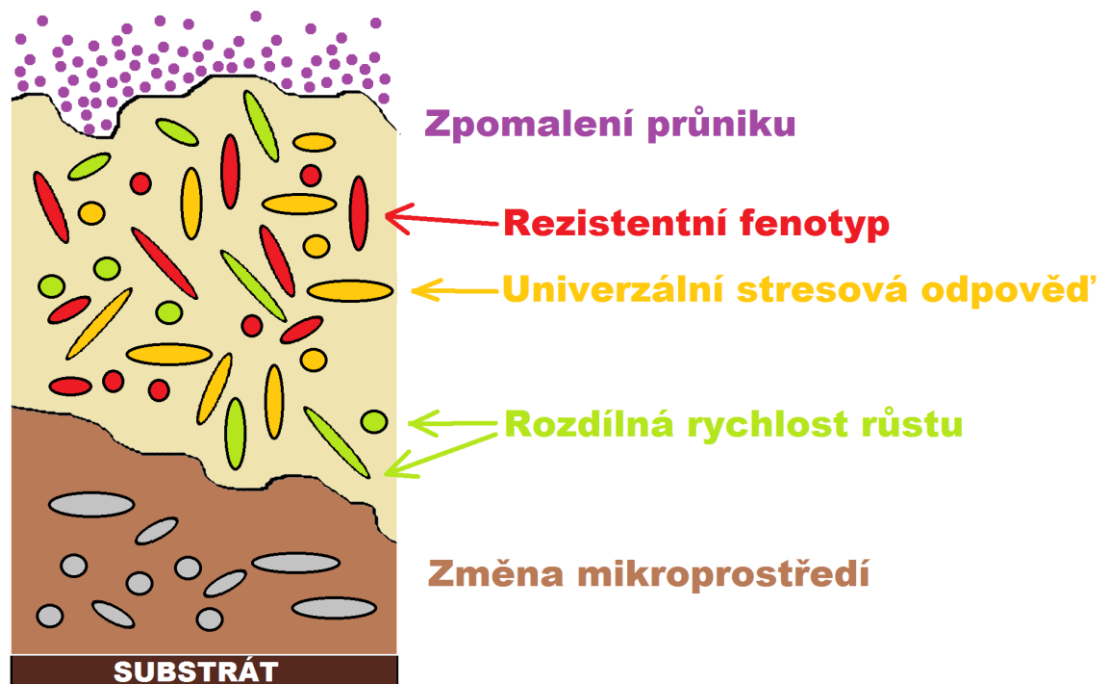
V buňce může dojít k substituci antibiotik a tím se obsadí vazebná místa na cílových molekulách, tudíž nemůže dojít k navázání samotného antibiotika [6, s. 191].

Působení všech těchto mechanismů může být jednotlivé, nebo se mohou vzájemně doplňovat. Mnohem složitější je tato problematika biofilmové rezistence u biofilmů tvořených více druhy mikroorganismů [6, s. 177].

Při terapii infekcí způsobených *P. aeruginosa* je vhodné využít kombinace dvou antibiotik, můžeme tak docílit zvýšení účinku, snížení případné toxicity a možnosti vzniku rezistence. V současné době se k léčbě infekcí *P. aeruginosa* nabízí řada antipseudomonádových antibiotik: Z protipseudomonádových penicilinů (např. piperacilin a jeho chráněná varianta s tazobaktamem), cefalosporinů III. (ceftazidim) a IV. (cefepim) generace, karbapenemů (imipenem, meropenem), protipseudomonádových aminoglykosidů (netilmicin, amikacin) nebo fluorochinolonů (ciprofloxacin, levofloxacin) apod. [16, s. 35-36]. Pro inhibici tvorby biofilmu *P. aeruginosa* se využívá makrolidových antibiotik, která inhibují jak tvorbu alginátu, také reakci protilátek na něj a zároveň potlačují systém QS [6, s. 103].

Antimikrobiální léčba infekce úspěšně odstraní planktonicky žijící buňky a část buněk žijících v biofilmu. Imunitní systém si rovněž dokáže poradit s planktonickými buňkami, ale nedokáže zničit buňky v biofilmu. Výsledkem je malé množství buněk, které se mohou po skončení léčby znovu začít množit. Výsledkem je recidiva infekce [6, s. 176].

[Zadejte text.]



Obrázek 4: Mechanismy rezistence biofilmu k antimikrobiálním látkám a bakteriální buňky, které ovlivňují [6, s. 177].

4 INFEKCE PSEUDOMONAS AERUGINOSA U PACIENTŮ S CYSTICKOU FIBRÓZOU A TVORBA BIOFILMU

Cystická fibróza je autozomálně recesivní, dědičné onemocnění se závažnou prognózou. Onemocnění způsobuje mutace CFTR genu na lokusu 7q31.2. Incidence tohoto onemocnění v České republice je podle posledních údajů 1: 2700 narozených dětí. Ročně je to 40-50 novorozenců. U těchto dětí je důležitá včasná diagnostika tohoto onemocnění, tj. do dvou měsíců od narození výrazně ovlivní léčbu a sní související prognózu onemocnění.

V České republice může být až každý 26. člověk přenašečem mutace tohoto genu. Toto onemocnění postihuje hlavně dýchací a trávicí soustavu. Často je doprovázené i poruchou plodnosti. U pacientů s cystickou fibrózou je zřetelné značné neprospívání organismu, výrazně slaný pot. K prvním projevům onemocnění dochází v dětství a s přibývajícím věkem dochází k jejich výraznému zhoršení. Cystická fibróza je onemocnění nevléčitelné, léčbou lze její projevy pouze zmírnit.

[Zadejte text.]

Cystická fibróza dříve také nazývána mukoviscidóza kvůli vazkému hlenu, který se tvoří ve žlázách s vnitřní sekrecí, jako jsou potní žlázy, slinivka břišní, hlenové žlázy ve výstelce průdušek aj. Příčinou je porucha transportu sodných a chloridových iontů. Hlen, který se tvoří, má vyšší viskozitu. Tento hlen je až 10x hustší než u zdravých lidí a tím znemožňuje pohyb řasinek, proto je z plic obtížně odstraňován. Spolu s hlenem nemohou být tedy odstraňovány ani bakterie, které do plic přišly spolu s vdechnutým vzduchem z důvodu poruchy mukociliární funkce [6, s. 101].

První kolonizace *P. aeruginosa* převládají ve srovnání s jinými bakteriálními druhy u dospívajících pacientů. Obvykle v průběhu několika let přechází akutní infekce v chronickou, která vede k poškození okolních tkání a následné plicní nedostatečnosti a smrti [6, s. 101]. Jako jedna z možností prevence by připadalo v úvahu využití polyvalentních vakcín připravených ze somatických O antigenů *P. aeruginosa* [16, s. 35].

Mezi nepříznivé vlivy, které mohou na *P. aeruginosa* v plicích působit patří aktivované polymorfonukleární leukocyty, které se nachází na výstelce dýchacích cest. Tyto buňky uvolňují toxické kyslíkové radikály, což vede ke vzniku biofilm produkujících bakteriálních buněk založených na mutaci genu *mucA*, jehož produkt zahajuje pochody nutné k expresi operonu pro biosyntézu alginátu [6, s. 102-103]. Alginát účinkuje například jako mitogen a polyklonální aktivátor B-buněk, čímž přispívá ke zvýšení hladiny gamaglobulinu, které je vždy spojeno se zhoršením klinického stavu. S tím souvisí, že přítomnost protilátek třídy IgG a IgA proti alginátu koreluje se špatnou funkcí plic.

Úloha alginátu je chránit buňky biofilmu proti nepříznivým vnějším podmínkám, které panují v plicích při cystické fibróze. *P. aeruginosa* na tyto stresové podmínky reaguje zvýšením tvorby alginátu. *P. aeruginosa* je totiž schopna růst v podobě biofilmu, aniž tvoří alginát. Tvorba alginátu není pro vznik biofilmu nutná, ale ovlivňuje jeho vývoj a konečný vzhled [6, s. 102-103].

Biofilm obsahuje i jiné látky, které jsou významné pro patogenezi *P. aeruginosa*. Pigment pyocyanin a jeho derivát 1-hydroxyfenazin působí jako inhibitory mitochondriálních enzymů v savčích tkáních a způsobuje zpomalení až úplné zastavení pohybu řasinek ciliárního epitelu. Tímto dochází k narušení primární nespecifické obrany hostitele a znemožnění eliminace patogenních bakterií. Pyocyaninem způsobené zpomalení řasinek je spojeno s poklesem intracelulárního cyklického adenosin 5'-monofosfátu (AMP) a adenosin 5'-trifosfátu (ATP) [18, s. 1115].

[Zadejte text.]

Vzniku pseudomonádového biofilmu brání složka vrozené odolnosti- laktoferin, produkovaná leukocyty. I v nízkých koncentracích laktoferin chelatuje železo. Nedostatek železa podněcuje dceřiné buňky k pohybu. Ty pak nezůstávají na místě, netvoří shluky, a tudíž nedochází ani k tvorbě biofilmu.

Laktoferin je však rozkládán proteolytickými enzymy pocházejícími jak z mikrobiálních buněk, tak z buněk lidských například enzymem katepsinem. Což vede k opětovnému zvýšení hladiny železa, která má za následek přechod buněk z planktonického způsobu života do přisedlého a následnou tvorbu biofilmu [6, s. 102-103].

4.1 Identifikace a klonální analýza

P. aeruginosa je gramnegativní, nefermentující tyčinka, nesporuluje a nemá pouzdro. Její pohyb zajišťuje jeden nebo dva polárně umístěné bičíky. Je striktně aerobní. Anaerobně může růst jen v přítomnosti nitrátů. Není náročná na podmínky, roste i na jednoduchých půdách v širokém rozmezí teplot. Většina kmenů mají typický vzhled kolonií, které mají perleťový až kovový vzhled, produkují pigment. Jejich výskyt provází charakteristický zápach. *P. aeruginosa* může tvořit celou řadu pigmentů. Většina z těchto pigmentů je zelených (odtud pochází druhové jméno *aerugo* - měděnka). Mezi nejčastější pigmenty patří modrozelený pyocyanin (z řeckého *pyon* - hnis, *kyaneos* - modrý) a žlutozelený fluorescein. *P. aeruginosa* má typickou vůni. Mladé kolonie mají ovocnou vůni, starší kolonie páchnou po amoniaku. *P. aeruginosa* vykazuje pestrou biochemickou aktivitu, která je využita v testech k její identifikaci. Štěpí řadu cukrů a vykazuje oxidázovou aktivitu, v testu reaguje velmi rychle do 30 sekund. Dále také vykazuje katalázovou a ureázovou aktivitu. Biochemická identifikace je významná zejména u nepigmentovaných kmenů *P. aeruginosa*, které tvoří 5-20% všech izolátů tohoto druhu [16, s. 35]. Pro účely typizace k potvrzení podobnosti klonů se využívá: typizace pomocí bakteriocinů (pyocynů), typizace pomocí bakteriofágů, serologická typizace za pomoci O-antigenů, H-antigenů. Na základě somatických antigenů rozlišujeme 17 sérotypů. Téměř všechny kmeny však patří ke 4 až 5 sérotypům. Kromě somatických antigenů mají pseudomonády také antigeny bičíkové a fimbriální. Jako nejjednodušší a nejspolehlivější se používá sérotypizace a typizace pomocí pyocinů.

[Zadejte text.]

Pro identifikaci na základě DNA se využívá například restriční endonukleázová analýza (*restriction endonuclease analysis*) nebo metody využívající PCR jako je třeba RAPD PCR [7, s. 297-298]; [16, s. 35]; [18, s. 1118-1120].

Hmotnostní spektroskopie MALDI (*matrix assisted laser desorption/ionization*, ionizace laserem za přítomnosti matrice) v kombinaci s detektorem TOF (= *time of flight*= doba letu) se využívá pro analýzy nukleových kyselin nebo nízkomolekulárních organických i anorganických látek [19].

Klonální analýzu lze provést pomocí RAPD (*random amplification of polymorphic DNA*) PCR, která využívá krátkých primerů a nízké teploty annealingu.

4.2 Biologické vlastnosti

P. aeruginosa je adaptibilní, přirozeně rezistentní k desinfekčním látkám a antibiotikům. *P. aeruginosa* je oportunní patogen, infekce se rozvíjí hlavně u pacientů rizikových věkem, imunosupresivní terapií nebo celkovým těžkým stavem [7, s. 297-298]. Velká adaptabilita je podmíněna jedním z největších bakteriálních genomů s velikostí 6,3 Mbp a největší známou proporcí (8,4%) regulačních genů. Kmeny *P. aeruginosa* většinou produkují dva exotoxiny (exotoxin A, exoenzym S) a další cytotoxické látky jako jsou například: proteázy, fosfolipázy, pyocyanin a ramnolipidy. Kmeny mukózního fenotypu produkují exopolysacharid alginátového typu. Význam těchto předpokládaných faktorů virulence závisí na místě a povaze infekce. Proteázy se uplatňují při vzniku vředu na rohovce, exotoxin a proteázy se uplatňují například u popálenin a fosfolipázy, proteázy a alginát hrají roli u chronické plicní kolonizace [7, s. 298].

4.3 Výskyt

Rod *Pseudomonas* obsahuje více než 200 druhů. Běžně se vyskytují v přírodě například ve vodě, půdě. Většina těchto druhů je saprofytických, některé druhy jsou ale patogenní pro rostliny, hmyz, zvířata a člověka.

Mezi patogeny člověka patří hlavně *P. aeruginosa*, v některých oblastech světa také *P. mallei* a *P. pseudomallei* [7, s. 297].

P. aeruginosa je oportunní patogen, může se běžně vyskytovat na kůži, hlavně v axilární oblasti. Největší hrozbou je však pro oslabené jedince. Její výskyt je

[Zadejte text.]

nežádoucí hlavně v nemocničním prostředí. Rychle nabývá rezistence vůči antibiotikům, má mnoho faktorů virulence [7, s. 297-298].

5 CÍL

Průkaz biofilmu *P. aeruginosa* ve sputu pacientů s CF pomocí nově zavedených mikroskopických technik, stanovení citlivosti klinických kmenů *P. aeruginosa* k vybraným antibiotikům a rešerše nových metod pro stanovení citlivosti biofilmu k antibiotikům.

6 MATERIÁL

6.1 Kontrolní kmeny

P. aeruginosa CCM 1960 (Česká sbírka mikroorganismů, PřF MU, Brno)

6.2 Analyzované klinické izoláty

	forma	pacient	věk	materiál	oddělení
142	M	A	18	sputum	Centrum cystické fibrózy, Motol
143	S		18	sputum	Centrum cystické fibrózy, Motol

6.3 Kultivační média, diagnostické soupravy

Mueller-Hinton agar (CM337, *Oxoid*, Velká Británie)

Mueller-Hinton bujón (CM405, *Oxoid*, Velká Británie)

Diagnostické soupravy ke stanovení MIC, gramnegativy I. a II. řada (*Trios*, ČR)

Etest (*AB Biodisk*, Švédsko)

Antibiotické disky (*Oxoid*, Velká Británie)

[Zadejte text.]

6.4 Materiál pro molekulárně biologickou analýzu

6.4.1 Roztoky

5% Chelex® 100 resin solution (Sigma-Aldrich, Gillingham, UK)

6.4.2 Primery, reagentie pro PCR

primer RAPD1, primer RAPD2 (Dřevínek, Pediatrická klinika Motol)

PCR mix (*Taq* polymerázy, nukleotidy, Mg⁺⁺ ionty)

gel pro elektroforézu (Agilent BioAnalyser, USA)

reagentie pro PCR (Agilent BioAnalyser, USA)

7 METODY

7.1 Odběr klinického materiálu

Jako materiál pro průkaz infekce dolních dýchacích cest pacientů s CF se používá sputum. Optimální je provádět odběr ráno. Pacient si před odběrem vypláchne ústa vodou. Pacient vykašlává hlenovitý sekret z dolních cest dýchacích přímo do sterilní odběrové nádoby. Nádobku se sputem uzavřeme, řádně označíme a zašleme do laboratoře. Materiál je vhodné zpracovat do 2 hodin po odběru.

Odběr sputa provádíme před zahájením antimikrobiální léčby. V průběhu léčby se odběr provádí, pokud dojde k zhoršení stavu pacienta (exacerbaci) nebo u pacientů s CF v průběhu pravidelných kontrol, které jsou prováděny v optimálním případě 4 krát ročně [17].

7.2 Mikroskopie sputa a bakteriálních kultur

Pro průkaz biofilmu se nejčastěji využívá světelné mikroskopie. Za pomoci vhodných barviv lze odlišit biofilm i jednotlivé druhy bakteriálních buněk. Pozorování biofilmu za pomoci světelného mikroskopu je limitováno tloušťkou biofilmu, skrz kterou pronikne světlo.

[Zadejte text.]

K vizualizaci vytvořeného biofilmu či jeho jednotlivých složek lze použít také fluorescenční mikroskopie. Vhodným barvením lze pozorovat biofilm vytvořený na povrchu neprůhledných předmětů, jako jsou například katetry nebo kloubní náhrady. Dále se dá využít k posouzení metabolické aktivity buněk uvnitř biofilmu.

Konfokální laserová mikroskopie je využívána pro pozorování biofilmů o větší tloušťce (5-10 μ m) [6, s. 65]. Je schopna analyzovat prostorové struktury biofilmu.

Elektronová mikroskopie (EM) se běžně nepoužívá k průkazu biofilmu, hlavně asi proto, že nepracuje s živými buňkami [14]. S její pomocí však lze sledovat prostorové uspořádání biofilmu (SEM).

7.2.1 Světelná mikroskopie

Mikroskopii jsme provedli z bakteriální kultury izolované od pacienta s CF (A). Izolát *P. aeruginosa* disocioval a rostl v koloniích typických jak pro mukózní (M) tak pro hladký (S) fenotyp (Obrázek 19, kapitola 8.2.1). Z těchto kultur jsme připravili preparáty pro světelnou mikroskopii a zafixovali je nad plamenem. Takto připravená podložní sklička s biomasou jsme dále barvili dle Grama, karbolfuchsinem, krystalovou violetí nebo tuší.

7.2.2 Elektronová mikroskopie

Příprava biologického materiálu

Nejprve jsme si vyočkovali kmeny *P. aeruginosa* s M a S fenotypem na MH agar a kultivovali 48 hodin v termostatu při 37°C.

A. Příprava vzorků zalitím do agarózy

Zalévání vzorků do agarózy se provádí u materiálů, které nejsou celistvé jako například buněčné suspenze.

Postup:

- a) Připravili jsme si 2% *low melting point* agarózu do které jsme při 40°C vmíchali biomasu (Obrázek 5a). Mukózní kolonie se špatně resuspendují, proto jsme biomasu nenechali ve větších částech. Hladké kolonie (S) jsme bez větších problémů přenesli do agarózy.

[Zadejte text.]

- b) Agarózu s koloniemi jsme pipetou po kapkách přenesli na podložní sklíčko (Obrázek 5b).
- c) Spodní podložní sklíčko s kapkami agarózy a biomasy jsme přiklopili druhým vrchním podložním sklíčkem. Mezi oběma sklíčky byla po stranách umístěna další dvě sklíčka tak, aby po přikrytí spodního podložního sklíčka vrchním podložním sklíčkem vznikla mezera 1mm (Obrázek 5c).
- d) Po zchladnutí a ztuhnutí agarózy jsme vrchní podložní sklíčko sejmuli. Přípraveným krycím sklíčkem jsme agarózu nařezali tak, že vznikly krychličky o hraně 1mm (Obrázek 5d).
- e) Nakrájenou agarózu jsme umístili do zkumavky s fyziologickým roztokem (Obrázek 5e), aby nedošlo k jejímu vysychání.

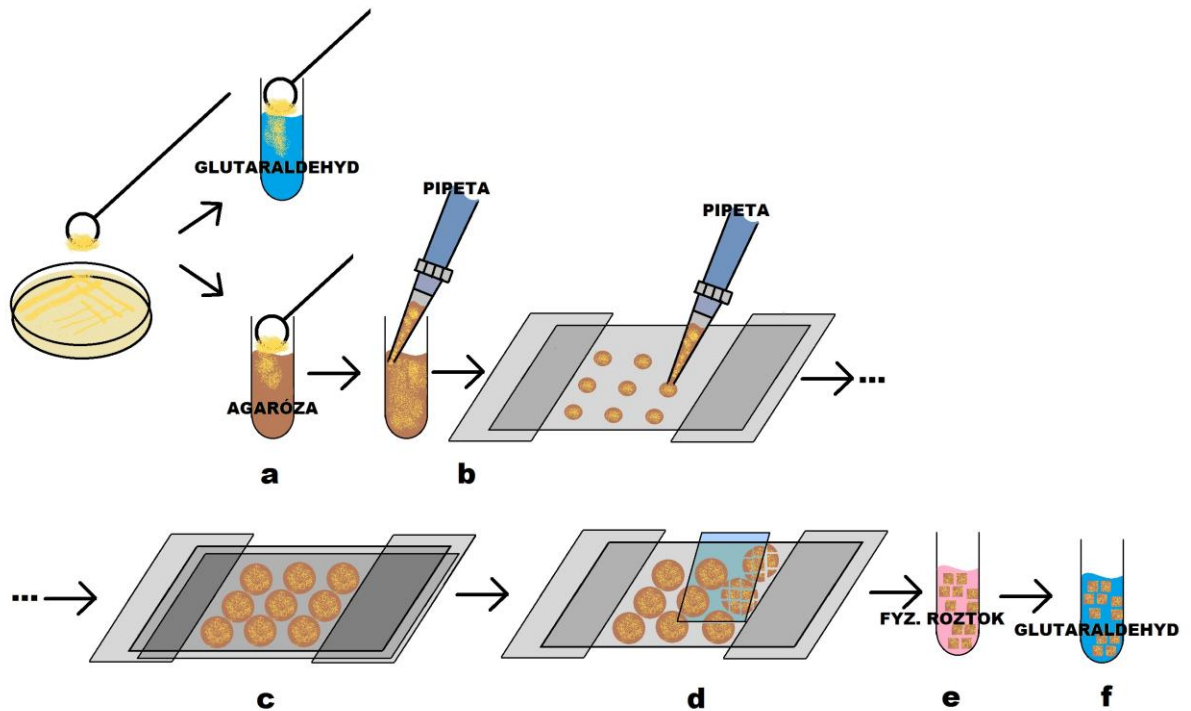
Připravili jsme si 4 zkumavky s 2,5% glutaraldehydem. Vzali jsme zkumavku s nakrájenou agarózou a fyziologickým roztokem, odsáli fyziologický roztok a nahradili ho glutaraldehydem (Obrázek 5f) a tím agarózu a buňky v ní obsažené zafixovali.

B. Příprava vzorků resuspendováním biomasy v glutaraldehydu

Do zbylých dvou zkumavek s 2,5% glutaraldehydem jsme přenesli přímo biomasu z kultivační plotny.

Získali jsme tedy čtyři zkumavky, ve dvou je biomasa s mukózním fenotypem *P. aeruginosa* a ve dvou s hladkým fenotypem. Každá kolonie je zpracovaná dvěma způsoby, první je ve formě buněk zalitých v agaróze, druhý přímo resuspendovaná biomasa ve fixačním roztoku glutaraldehydu.

[Zadejte text.]



Obrázek 5: Postup zpracování biologického materiálu resuspendováním buněk v 2,5% glutaraldehydu nebo zaléváním do agarózy.

Zalévání do směsi Durcupan–Epon

Zalévání vzorků se provádí proto, aby bylo možné vzorky krájet na ultratenké řezy, které se dále zpracovávají.

Modifikace pro materiál, který nelze rychle získat v den zpracování, např. z důvodů složitější přípravy nebo delšího transportu. Tímto způsobem se dají zpracovávat solidní vzorky tkáně nebo třeba buněčné suspenze imobilizované agarózou (velikost vzorku ideálně kolem 1 mm^3).

V případě neimobilizovaných buněčných suspenzí je zapotřebí vždy před výměnou roztoku vzorek centrifugovat a opět roztřepat. Obvykle stačí 5 min při 1.000 ot/min mezi kroky 1,2 a 2,3. Na konci kroku 3 se vzorek centrifuguje 5 min při 13.000 ot/min. Většinou vznikne pevná peleta, která se dá rozdělit na kousky o vhodné velikosti, se kterými se dále pracuje jako s tkáňovými vzorky. Pokud se peleta příliš rozpadá, musí se centrifugovat mezi každými dvěma dalšími kroky. Tímto postupem však dochází při promývání jednotlivými roztoky k částečným ztrátám vzorku. U vzorků u kterých předpokládáme, že nevytvoří peletu, volíme jiné postupy k získání kompaktního materiálu, tím může být právě zalití do agarózy.

[Zadejte text.]

Vzorky se promývají jednotlivými roztoky ve zkumavkách vhodné velikosti (obvykle plastové zkumavky s plochým dnem o objemu 10 ml nebo eppendorfky). Je vhodné zkumavky občas promíchat. Jednotlivé roztoky vyměňujeme pomocí pasteurových pipet.

Postup:

1. Vzorek (agarózu s buňkami nebo peletu ze suspenze buněk) umístíme přes noc nebo i déle do 2,5% glutaraldehydu v kakodylátovém pufru pH 7,2.
2. Vzorek opláchneme kakodylátovým pufrům pH 7,4.
3. Přeneseme do 2% OsO₄ v kakodylátovém pufru o pH 7,4 necháme reagovat 60 min.
4. Dále převedeme do roztoku 50% alkoholu ředěného 1% uranylacetátem (2,5 ml 100% alkoholu + 2,5 ml UA), necháme reagovat 15 min.
5. Následuje roztok 70 % alkoholu ředěný 1% uranylacetátem (3,5 ml 100% alkoholu + 1,5 ml UA), necháme reagovat 15 min.
6. Vzorek dále umístíme do roztoku 90% alkoholu ředěného 1% uranylacetátem (4,5 ml 100% alkoholu + 0,5 ml UA), po dobu 15 min.
7. Dále vzorek přeneseme do 100% alkoholu a necháme 30 minut reagovat, opakujeme 5x.
8. Následuje roztok 100% alkoholu a propylenoxidu v poměru 1:1, necháme reagovat 15minut, opakujeme 2x.
9. Dále vzorek umístíme do propylenoxidu na 30 min, opakujeme 3x.
10. Následuje propylenoxid + Durcupan-Epon 1:1 – po dobu 60 min.
11. Dále Durcupan-Epon – přes noc.
12. Ráno provádíme bločkování.
13. Následuje polymerizace 72 hodin při 58°C (ne přes 60°C).

Příprava směsi Durcupan-Epon

Základní dávka – 26,25 ml

Obsah 1 želatinové bezbarvé kapsle – 0,4 ml (průměr kapsle 6 mm, délka 16 mm).

Před vážením je třeba komponenty vytemperovat v pokojové teplotě 3-4 h

[Zadejte text.]

Durcupan AM: 5 ml = 5,6 g

Epon 812: 6,25 ml = 7,6 g

Durcupan B (hardener): 15 ml = 15,8 g

Durcupan C (akcelerátor): 2% = 0,6-0,7 ml

Mícháme skleněnou tyčinkou po dobu 30 min.

Kontrastování ultratenkých řezů

Kontrastování se provádí, aby se dosáhlo vizualizace jednotlivých struktur vzorku.

Příprava reagensů:

Příprava citrátu olova:

Přibližně každé 2 měsíce je třeba připravit čerstvý roztok.

Do 50 ml baňky navážíme:

1,33 g dusičnanu olovnatého $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$

1,76 g citrátu sodného

30 ml destilované vody

Roztok třepeme 30 minut, 1 minutu usilovně. Přidáme 8 ml 1M NaOH (musí dojít k vyjasnění roztoku). Destilovanou vodou doplníme na objem 50 ml.

Příprava 1 M NaOH :

Ve 100 ml destilované vody rozpustíme 4 g NaOH.

Příprava 0,01 N NaOH :

Do 99 ml destilované vody přeneseme 1ml 1 M NaOH.

Postup:

1. Na miskou s voskem (nebo parafilmem) nakapeme 2% uranylacetát
2. Do kapky se položí síťka s řezem- řezem dolů. Každá síťka má vlastní kapku UA. Síťku bereme opatrně pinzetou za krajíček síťky. Necháme reagovat 5 minut. Čas je nutné přesně dodržet, proto používáme stopky.

[Zadejte text.]

3. Síťku vyjmeme z UA, rychle opláchneme destilovanou vodou a necháme osušit na filtračním papíře- řezem nahoru.
4. Na misku s voskem (nebo parafilmem) nakapeme citrát olova.
5. Do kapky umístíme síťku řezem dolů a barvíme 1 min.
6. Síťku opláchneme 0,01 M NaOH a destilovanou vodou.
7. Síťku necháme osušit na filtračním papíře- řezem nahoru.

7.2.3 Imunofluorescenční mikroskopie

Barvení calcofluorem

Calcofluor je sice nespecifický fluorochrom, který se váže na celulosu a chitin obsažený v buněčné stěně hub a dalších organismů. Barvení se používá na průkaz původců mykotických infekcí. Při analýze pacientů s CF s chronickou infekcí je však vysoce specifický pro průkaz EPS biofilmů. Barvení calcofluorem bylo provedeno ve spolupráci s MUDr. Vandou Chrenkovou z Ústavu lékařské mikrobiologie ve FN Motol.

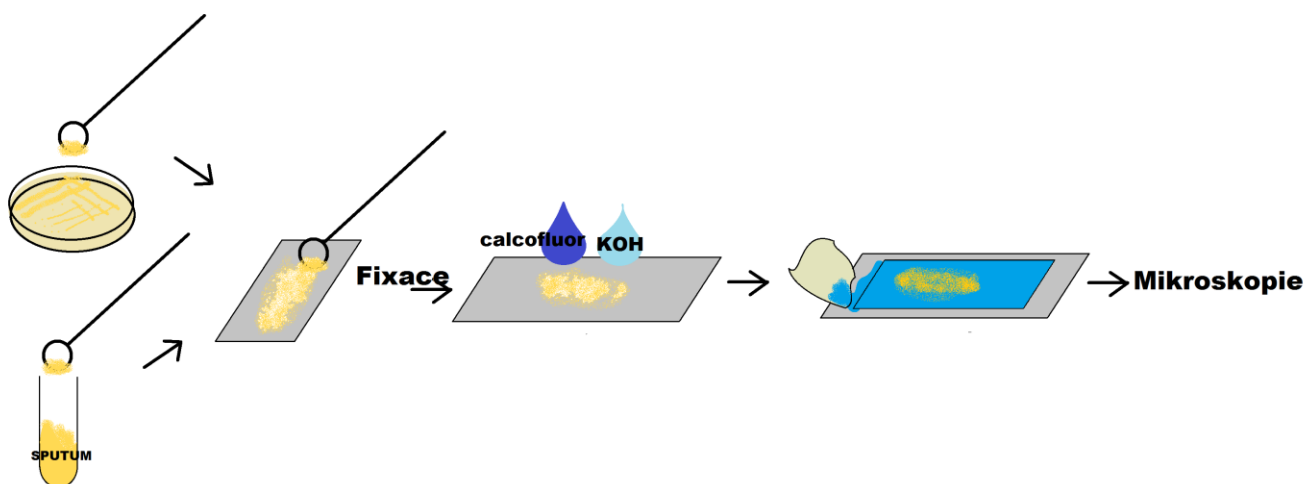
Postup (Obrázek 6):

Připravili jsme si několik sad podložních sklíček se vzorky. První sada podložních sklíček obsahovala patientské sputum. Na podložní sklíčko jsme nanесли sputum pacienta a zafixovali metanolem. Druhá sada byla připravena z čerstvé bakteriální kultury *P. aeruginosa* s mukózním (M) a hladkým (S) fenotypem.

Sterilní kličkou jsme nabrali část kolonie nebo sputa a rozetřeli na podložní sklíčko. Preparáty jsme zafixovali metanolem nebo nad plamenem.

Na podložní sklíčko s připraveným preparátem jsme kápli jednu kapku calcofluoru a jednu kapku 10% KOH. Přikryli jsme krycím sklíčkem a buničinou odsály přebytečnou tekutinu. Obarvené preparáty jsme pozorovali fluorescenčním mikroskopem při 100- 400x zvětšení.

[Zadejte text.]



Obrázek 6 : Grafické znázornění postupu barvení calcofluorem

7.3 Kultivační průkaz *P. aeruginosa* s S a M fenotypem

7.3.1 Fenotypová identifikace

Fenotypová identifikace kmene 143S a 142M byla provedena pomocí skriningových metod (mikroskopie, produkuje oxidázu) a na základě hmotnostní spektrometrie (MALDI-TOF). Metody založené na kultivaci se nejčastěji používají k průkazu mukózních kmenů *in vitro*, které odpovídají přítomnosti biofilmu *in vivo* i ke studiu jejich fyziologie [6, s. 66].

7.3.2 Klonální analýza

Klonální analýza (typizace) bakteriálních izolátů slouží k jejich zařazení do jednotlivých kmenů (klonů). Podle informací o vyšetřovaných pacientech, lze zjistit zdroj infekce a pravděpodobnou cestu jeho přenosu. Tyto informace mají zásadní význam v epidemiologii onemocnění. Kmeny *P. aeruginosa*, které pocházejí od pacientů s CF nejsou, až na výjimky, epidemiologicky příbuzné a patří k různým klonům. V literatuře je však popsáno několik epidemických klonů *P. aeruginosa*. Pacienti s CF jsou nejdříve kolonizováni a později infikováni většinou kmenem *P. aeruginosa*, který pochází nejčastěji z venkovního prostředí.

[Zadejte text.]

Ke klonální analýze *P. aeruginosa* lze využít celou řadu typizačních metod, které jsou založené na makrorestrikční analýze celogenomové DNA pomocí pulzní elektroforézy, fingerprintových metodách (např. metoda RAPD) nebo na sekvenční analýze genů *P. aeruginosa* [20, s. 23].

Pro analýzu kmenů byla použita metoda RAPD PCR. Výhodou metody je, že není nutné znát specifické primery pro analyzované bakteriální druhy. Používají se krátké primery (10 bp) v kombinaci s nízkou teplotou annealigu (34-37°C). Metoda však má nízkou reprodukovatelnost (při opakování se získají různé profily u stejného kmene), což je způsobené hlavně rozdíly při odečítání profilů v gelu. Tuto nepřesnost odstraňuje standardizovaná elektroforéza na malém gelu, pomocí *mikrofluid* technologie (*Agilent Bioanalyser, USA*) kdy reprodukovatelnost získaných profilů je velmi vysoká [20, s. 37-38].

7.4 Stanovení citlivosti k antibiotikům

Testování citlivosti k antibiotikům je důležité pro léčbu pacienta, ale i z důvodů monitorování rezistence v rámci oddělení, nemocnice nebo regionu.

Mnoho bakterií totiž vykazuje v testech prováděných *in vitro* citlivost k různým antimikrobiálním látkám a chemoterapeutikům, přitom je k těmto látkám rezistentní. V současné době přibývá kmenů bakterií, které jsou rezistentní k těm antibiotikům, ke kterým byly dříve citlivé. Tato skutečnost může být velmi závažná například v nemocničním prostředí, kde se mohou snadno šířit rezistentní kmeny bakterií. Nemluvě o ekonomické stránce věci, kdy dochází k zvyšování nákladů na léčbu.

Testování citlivosti k antibiotikům lze provádět kvalitativními nebo kvantitativními metodami.

Kvalitativní testy

Testování citlivosti k antibiotikům se provádí převážně kvalitativní diskovou metodou. Jedná se o metodu nevyžadující přístrojové vybavení ani vysoké náklady na materiál. Je to tedy metoda, která se výborně hodí pro rutinní vyšetření citlivosti, a proto je vhodná i pro malé laboratorní provozy.

Přesto jsou tu i nevýhody. Například ji nelze použít pro pomalu rostoucí, náročné mikroby včetně anaerobních bakterií. Rovněž není vhodné tuto metodu používat pro vyšetření klinicky závažných stavů jako jsou například sepse,

[Zadejte text.]

endokarditidy, meningitidy a stavy provázené poruchou či snížením funkce imunitního systému jako jsou například AIDS, transplantace, těžké popáleniny apod..

Diskový difusní test sám o sobě téměř není schopen odhalit některé případy klinicky významné rezistence mikrobů. Zde je pak na místě užití jiných, speciálních postupů. Metoda se nehodí ani pro stanovení citlivosti k antibiotikům pro pomaleji rostoucí bakteriální patogeny pacientů s CF [11, s. 76, ústní sdělení, školitel].

Kvantitativní testy

Mezi kvantitativní testy patří například mikrodiluční metoda, která slouží k přesnému stanovení minimální inhibiční koncentrace (MIC) daného antibiotika či chemoterapeutika pro vyšetřovaný kmen. MIC je nejnižší koncentrace antimikrobiální látky, která dokáže zastavit růst testovaného kmene bakterie, udává se v jednotkách mg/l nebo v $\mu\text{g/ml}$. Obdobnou hodnotou je minimální baktericidní koncentrace (MBC). Tato hodnota udává koncentraci antimikrobiální látky, která je schopná vyšetřované bakteriální buňky zcela eliminovat [11, s. 76].

Diluční mikrometoda

Tato metoda se provádí v jamkách mikrotitračních destiček. Každá jamka obsahuje tekuté kultivační médium (MH bujón) a zředěné antibiotikum. V každém sloupci je antibiotikum ředěno geometrickou řadou. Na jednu lze testovat citlivost kmene až ke 12 antibiotikům. Za hodnotu MIC se považuje nejnižší koncentrace antibiotika, které zřetelně inhibuje růst vyšetřovaného kmene v jamce [11, s. 78-79].

Kombinované metody

Etest je kombinací difusního testu a diluční metody. Při této metodě se používá plastický proužek. Jedna strana proužku obsahuje exponenciální gradient koncentrací ATB látky, na druhé straně proužku je kód této látky a stupnice odpovídající ředěním antibiotika či chemoterapeutika. Po přiložení proužku na plotnu s naočkovaným, vyšetřovaným kmenem a následné inkubaci vzniká elipsovité inhibiční zóna stejně jako u DD metody. Hodnota MIC je v bodě, kde se hranice inhibiční zóny dotýká proužku [11 s. 79-80].

[Zadejte text.]

7.4.1 Stanovení citlivosti k antibiotikům diskovou difuzní metodou

Jedná se o metodu kvalitativní, jejímž účelem je prokázat, zda je daný kmen k antibiotiku citlivý či rezistentní. A podle výsledku zvolit správnou antibiotickou léčbu pacienta.

Základem této metody je vznik inhibičních zón, které se tvoří v blízkosti disků. Papirové disky jsou napuštěné zvoleným množstvím antibiotika, které se z nich uvolňuje. Koncentrace antibiotika v okolí disku se se vzdáleností od něj snižuje a vzniká tak koncentrační gradient. Přítomné bakterie se nemnoží ve vzdálenosti, kde koncentrace antibiotik dosahuje baktericidních nebo bakteriostatických hodnot. Podle velikosti inhibiční zóny (Tabulka 1) lze určit, zda je testovaný kmen k danému antibiotiku citlivý či rezistentní.

Postup:

1. Nejprve si připravíme inokulum ve fyziologickém roztoku o zákalu 0,5 Mc Farlanda ($1,5 - 3,0 \cdot 10^8$ CFU na 1 ml suspenze).
2. Pomocí vatového tampónu rozetřeme suspenzi po celé ploše Mueller-Hinton agaru v několika směrech.
3. Necháme zaschnout a po té nanášíme antibiotické disky.
4. Plotny umístíme do termostatu na 24-48 hodin. Misky se pokládají dnem vzhůru, neboť vysrážená kondenzní voda by mohla znehodnotit výsledek testu.

Antibiotikum difunduje z disku a vytváří koncentrační gradient v okolí disku.

Pro reprodukovatelnost a srovnatelnost výsledků je nezbytné dodržet správné podmínky, jako jsou například standardní složení půdy, vrstva agaru, koncentrace inokula, výběr vhodných a kvalitních antibiotických disků, teplota a doba inkubace, správné odečtení velikosti inhibičních zón a interpretace výsledků [12]; [11, s. 73]. Interpretace výsledků diskového testu se provádí podle kritérií *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), pro jednotlivá antibiotika (Tabulka 1).

[Zadejte text.]

antibiotikum	inhibiční zóna	antibiotikum	inhibiční zóna
CT-colistin (10µg)	10 mm	CIP-ciprofloxacin (5µg)	21 mm
CN-gentamicin (10 µg)	15 mm	OFX- ofloxacin (5µg)	16mm
NET-netilmicin (30µg)	15 mm	FEP-cefepim (30µg)	18 mm
TOB-tobramycin (10 µg)	15 mm	SCF-cefoperazon/sulb. (105µg)	21 mm
TZP-piperacilin/taz. (30µg)	18 mm	IMI-imipenem (10µg)	16 mm
CAZ-ceftazidim (30µg)	18 mm	MEM meropenem (30µg)	16 mm
AK.amikacin (30µg)	17 mm	TGC-Tigecyklin (15µg)	19mm

Tabulka 1: Velikosti inhibičních zón pro citlivé kmeny *P. aeruginosa*

7.4.2 Stanovení minimální inhibiční koncentrace antibiotik (MIC)

Kvantitativní diluční metoda

Postup:

1. Nejprve si připravíme inokulum ve fyziologickém roztoku o zákalu 0,5- 1 Mc Farlanda ($1,5 - 3,0 \cdot 10^8$ CFU na 1 ml suspenze).
2. Toto inokulum přeneseme do jamek mikrotitrační destičky. Množství přeneseného inokula by nemělo přesáhnout desetinu objemu jamky (obvykle se očkuje 1 - 5 µl inokula). Očkování lze provádět vícekanálovou pipetou nebo s použitím replikátoru.
3. Po naočkování umístíme destičky do termostatu na 24 hodin při teplotě 35-37°C.

Růst bakterií se projeví zákalem na dně jamky. Pro jednotlivé antimikrobiální látky se odečítají nejnižší koncentrace, které zřetelně inhibují růst vyšetřovaného kmene (MIC= minimální inhibiční koncentrace). Dosaženou MIC pro dané antibiotikum je nutné porovnat s referenční hodnotou pro referenční citlivé kmeny, pokud je dosažená hodnota nižší, pak lze vyšetřovaný kmen označit jako citlivý pro dané antibiotikum [11, s. 78-79].

[Zadejte text.]

Vyhodnocení citlivosti k antibiotikům jsme provedli po 24 hodinách pro kmeny 142M a 143S. Po vyhodnocení jsme dali destičky dále inkubovat. Po celkové době inkubace 3 dnů jsme znovu vyhodnotily citlivost kmene 142M ke všem antibiotikům a citlivost kmene 143S k vybraným antibiotikům a porovnali hodnotu MIC.

ATB – GI	Obsah od – do ($\mu\text{g/ml}$)	ATB – G1	Obsah od – do ($\mu\text{g/ml}$)
AMP- Ampicilin	0,5 – 64	PIP- Piperacilin	1 – 128
AMS- Ampicilin/Sulbactam	0,25 – 32	PIP/PPT- Piperacilin/Tazobactam	0,5 – 64
CZL- Cefazolin	1 – 128	CPR- Cefoperazon	0,5 – 64
CRX- Cefuroxim	0,5 – 64	CTX- Ceftotaxin	0,125 – 16
CXT- Cefotaxim	0,5 – 64	CTZ- Ceftazidin	0,25 – 32
GEN- Gentamicin	0,25 – 32	CPM- Cefepim	0,063 – 8
COT- Cotrimoxazol	1 – 128	Cefoperazon/ Sulbactam	0,5 – 64

Tabulka 2: Rozmezí koncentrací pro jednotlivá antibiotika použitá pro stanovení MIC mikrodiluční metodou.

ATB – GI	Referenční hodnoty	ATB – GII	Referenční hodnoty
Ampicilin (AMP)	4,000 – 4,001	Piperacilin (PIP)	16,000 – 16,001
Ampicilin/Sulbactam (SAB)	8,000 – 8,001	Piperacilin/Tazobactam (TZP)	16,000 – 16,001
Cefazolin (CZL)	4,000 – 4,001	Cefoperazon (CPR)	8,000 – 8,001
Cefuroxim (CRX)	4,000 – 4,001	Cefotaxim (CTX)	4,000 – 4,001
Cefoxitin (CXT)	4,000 – 4,001	Ceftazidim (CTZ)	4,000 – 4,001
Gentamicin (GEN)	4,000 – 4,001	Cefepim (CPM)	4,000 – 4,001
Cotrimoxazol (COT)	4,000 – 4,001	Cefoperazon/ Sulbactam (CPS)	8,000 – 8,001
Colistin (COL)	32,000 – 32,001	Meropenem (MEM)	4,000 – 4,001

[Zadejte text.]

Kys. Oxolinová (OXO)	4.000 – 4,001	Ciprofloxacín (CIP)	1,000 – 1,001
Ofloxacin (OFL)	8.000 – 8.001	Tigecyklin (TIG)	1,000 – 1,001
Tetracyklin (TET)	2.000 – 2.001	Tobramycin (TOB)	4.000 – 4,001
Aztreonam (AZT)	8.000 – 8.001	Amikacin (AK)	8.000 – 8.001

Tabulka 3: Rozmezí koncentrace pro jednotlivá ATB

Etest

Postup:

1. Na povrch HM agarové plotny, naočkujeme za pomoci sterilního vatového tampónu inokulum o zákalu 0,5Mc Farlanda ($1,5 - 3,0 \cdot 10^8$ CFU na 1 ml suspenze).
2. Následně přiložíme na plotnu proužek Etestu tou stranou, která obsahuje antibiotikum.
3. Necháme růst v termostatu po dobu 24 - 48 hodin při 37°C.

Po inkubaci se hodnotí elipsa inhibiční zóny růstu kolem proužku. Hodnota MIC je koncentrace antibiotika v místě, kde elipsa inhibiční zóny protíná okraj proužku [11, s. 79-80].

7.4.3 Stanovení baktericidní inhibiční koncentrace biofilmu k antibiotikům (BIC)

V průběhu chronické infekce *P. aeruginosa* u pacientů s CF dochází z pravidla ke vzniku biofilmu v dolních dýchacích cestách. Tento fenomén je doprovázen mukózním (M) fenotypem, který interaguje s identifikací a stanovením citlivosti k ATB. Je známo, že mukózní kmeny jsou více rezistentní k antimikrobiálním látkám než kmeny s hladkým (S) fenotypem.

Z těchto důvodů byly navrženy modifikace metod, kterými se citlivost mukózních forem stanovuje.

[Zadejte text.]

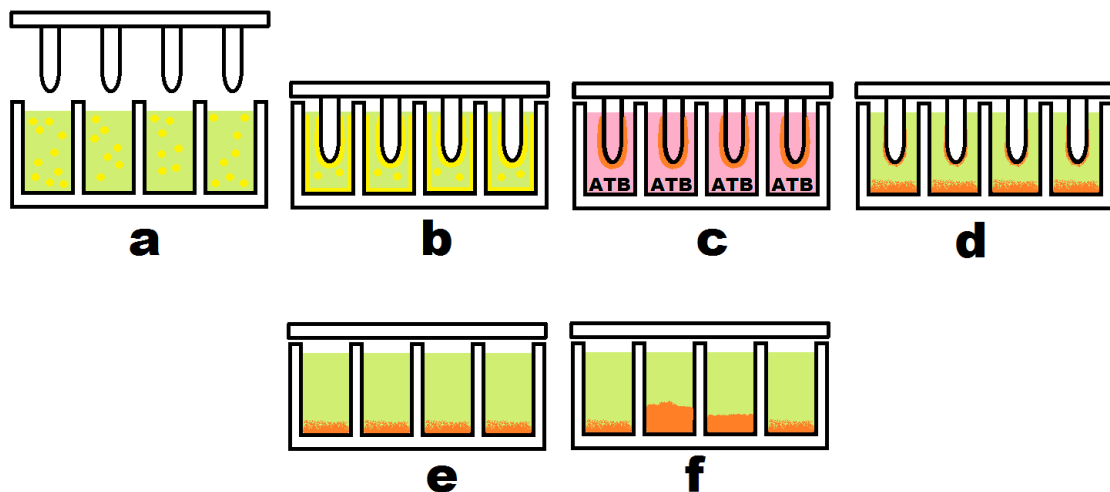
7.4.3.1 Vyšetření citlivosti pomocí *Biofilm susceptibility assay*

Postup:

1. Kmeny uchováváme při -80°C , vyočkujeme je a kultivujeme přes noc na CAMHB nebo na minimálním médiu.
2. Připravíme si buněčnou kulturu do živného média o zákalu 0,5 Mc Farlanda ($1,5 - 3,0 \cdot 10^8$ CFU na 1 ml suspenze).
3. Do každé jamky mikrotitrační destičky přeneseme 100 μl této suspenze (Obrázek 7a).
4. Následuje inkubace při 37°C po 20 hodin při houpaní o frekvenci 20Hz nebo v klidu. Během inkubace se vytváří vrstva biofilmu (Obrázek 7b).
5. Po 20 hodinách sejmeme víčko s kolíčky a třikrát ho opláchneme sterilní vodou.
6. Toto víčko přemístíme do nové mikrotitrační destičky, která však už obsahuje antibiotika (*antibiotic challenge plate*); (Obrázek 7c).
7. Destičku s antibiotiky inkubujeme po dobu 18- 20 hodin při teplotě 37°C .
8. Po té znovu vyjmeme víčko s kolíčky a třikrát opláchneme destilovanou vodou a umístíme do nové mikrotitrační destičky bez antibiotikové CAMHB (*biofilm recovery plate*).
9. Nyní je třeba převést biofilm z kolíčků do jamek (Obrázek 7d). Soupravu necháme temperovat při pokojové teplotě podobu 5min.
10. Destičku i s víčkem centrifugujeme 805 x g po dobu 20 minut. Mikrotitrační destičky mají tendenci se zlomit při vyšší centrifugační rychlosti.
11. Po ukončení centrifugace vyjmeme víčko s kolíčky a nahradíme ho standardním víčkem (Obrázek 7e).
12. Změříme absorbanci jednotlivých jamek při 650nm.
13. Po změření absorbance dáme destičku inkubovat po dobu 6 hodin teplotě 37°C .
14. Po inkubaci (Obrázek 7f) znovu změříme absorbanci v jednotlivých jamkách.

Pokud byl kmen k antibiotiku citlivý, nedojde při závěrečné kultivaci k růstu nebo je růst minimální, tudíž nedojde ani ke změně absorbance nebo je změna minimální. Za rezistentní je kmen považován, pokud rozdíl absorbance měřené před kultivací (0h) a po ukončení kultivace (6h) je větší než 0,05 [15].

[Zadejte text.]



Obrázek 7: Grafické znázornění postupu vyšetření citlivosti biofilmu za použití *Biofilm susceptibility assai* [15].

- Jamky mikrotitrační destičky se suspenzí buněk testovaného kmene.
- Tvorba biofilmu na kolíčkách víčka mikrotitrační destičky při inkubaci po dobu 20 hodin a teplotě 37°C.
- Biofilm narostlý na kolíčkách mikrotitrační destičky je vystaven působení antibiotik při inkubaci po dobu 18- 20 hodin a teplotě 37°C.
- Kolíčky s biofilmem, který byl vystaven účinkům antibiotik, přeneseme do jamek bez antibiotik. Biofilm je z kolíčků odstraněn a zůstává na dně jamek.
- Víčko s kolíčky je nahrazeno běžným víčkem a je změřena absorbance.
- Destička po inkubaci po dobu 6 hodin a teplotě 37°C. Některé jamky vykazují růst biofilmu. Druhé měření absorbance.

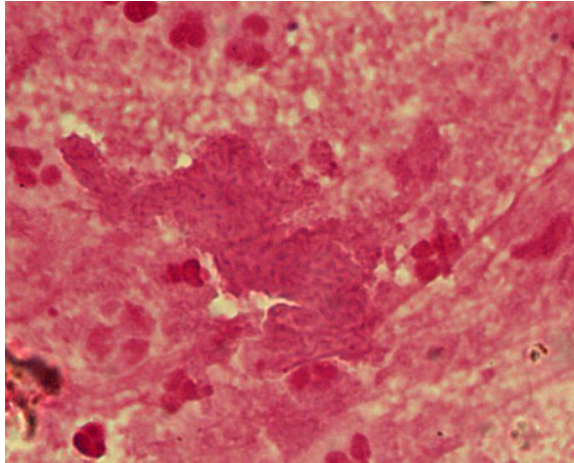
8 VÝSLEDKY

8.1 Mikroskopie spůta a bakteriálních kultur

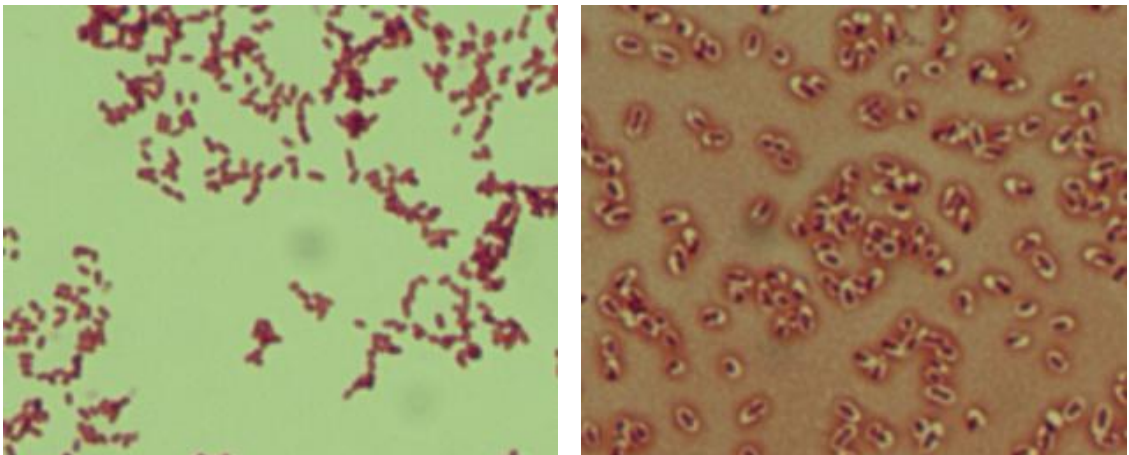
8.1.1 Světelná mikroskopie

Pomocí světelné mikroskopie v kombinaci s různými barvivy, jsme se snažili zachytit přítomnost struktur S a M kmene a vzájemně je porovnat.

[Zadejte text.]

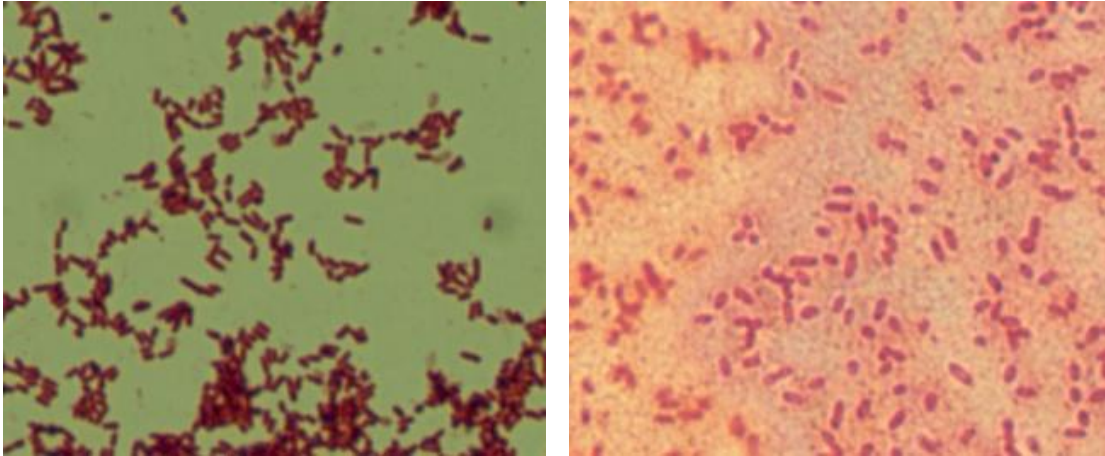


Obrázek 8: Biofilm (konglomerát v centru) ve vzorku sputa barveného podle Grama. Samotné buňky *P. aeruginosa* jsou viditelné jako zrnitá struktura. Na snímku jsou vidět ještě granulocyty.

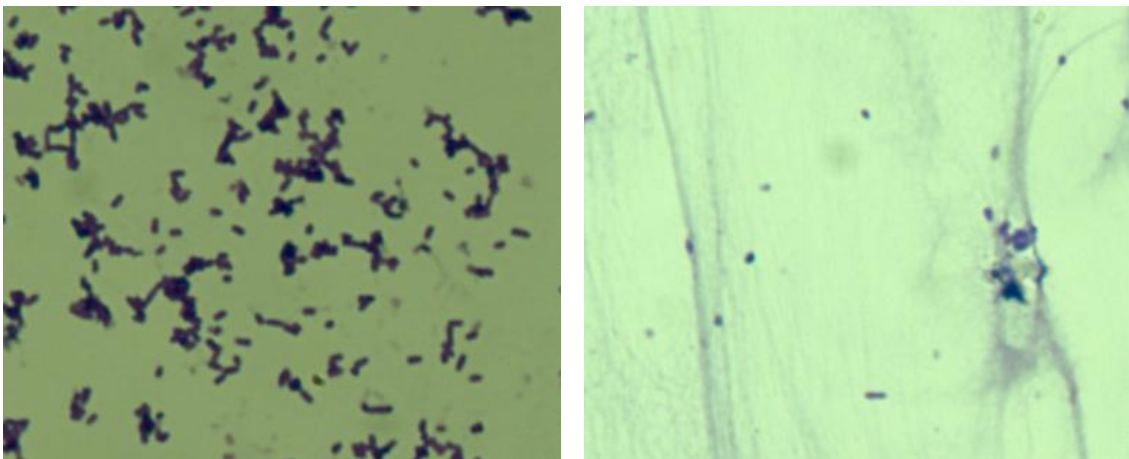


Obrázek 9: Preparáty barvené dle Grama, rozdílné barvení kmene 143S, S forma (vlevo) a mukózní formy 142M (vpravo) (foto: Mošničková)

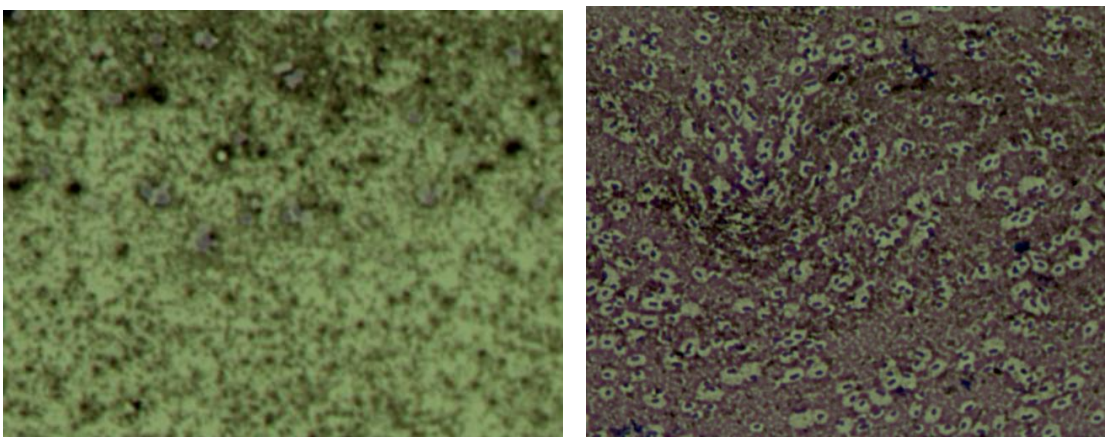
[Zadejte text.]



Obrázek 10: Preparáty barvené karbolfuchsinem, rozdílné barvení kmene 143S, S forma (vlevo) a mukózní formy 142M (v pravo) (foto: Mošničková)



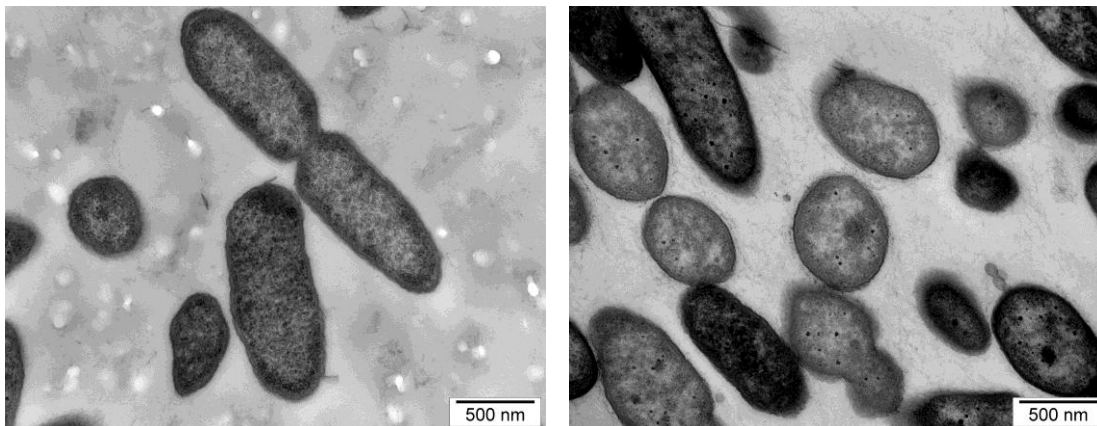
Obrázek 11: Preparáty barvené krystalovou violetí, rozdílné barvení kmene 143S, S forma (vlevo) a mukózní formy 142M (v pravo) (foto: Mošničková)



Obrázek 12: Preparáty barvené karbolfuchsinem a tuží, rozdílné barvení kmene 143S, S forma (vlevo) a mukózní formy 142M (v pravo) (foto: Mošničková)

[Zadejte text.]

8.1.2 Elektronová mikroskopie

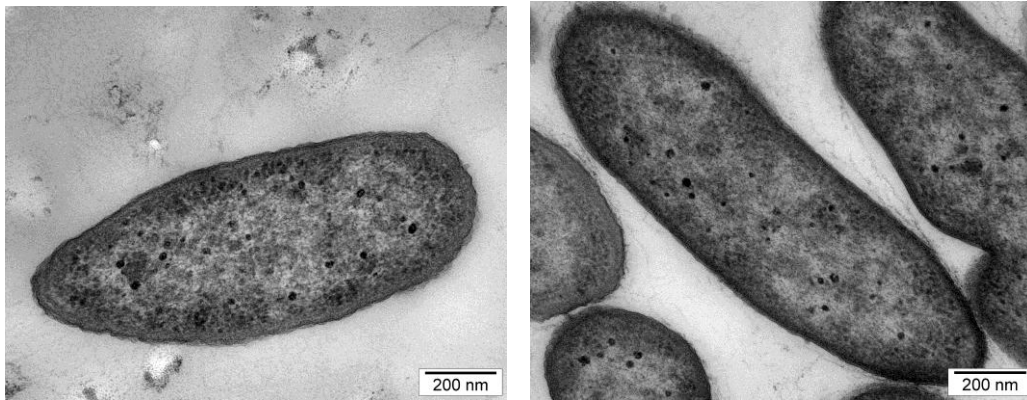


Obrázek č13: *P. aeruginosa* zobrazena pomocí TEM, rozdílné barvení kmene 143S, S forma (vlevo) a mukózní formy 142M (vpravo), měřítko 500 nm. Snímky byly pořízeny ze vzorků buněk resuspendovaných v glutaraldehydu (foto: Uhlík, Mošničková)

Snímky bakterií téhož kmene získané z agarózy s buňkami a ze suspenze buněk se lišily pouze v hustotě buněk. Ke zpracování vzorků zalitím do agarózy se přistupuje v případě, kdy nelze vytvořit peletu. Do agarózy se však musí přenést velké množství buněk.

Při zpracování vzorků kmen 143S netvořil pelety, materiál nebyl kompaktní a stále se rozpadal. Mezi jednotlivými buňkami byla pozorována hmota, která by mohla bránit soudržnosti pelety. Tato hmota však nevykazovala žádnou vláknitou strukturu. (viz Obrázek 13 vlevo). Buňky kmene 142M tvořily kompaktní peletu, která se nerozpadala. Mezi jednotlivými buňkami kmene 142M jsou pozorovatelné vláknité útvary, mohlo by se jednat o extracelulární látky produkované buňkami *P. aeruginosa* izolátu 142M (Obrázek 14 vpravo). Obrázky získané ze vzorků zalitých do agarózy nebyly do přehledu zařazeny z důvodu příliš nízké koncentrace buněk. Způsob zpracování vzorků zalitím do agarózy by byl vhodný u kmene 143S s hladkým fenotypem. Je však třeba dbát na to, aby bylo do agarózy přeneseno opravdu velké množství biomasy.

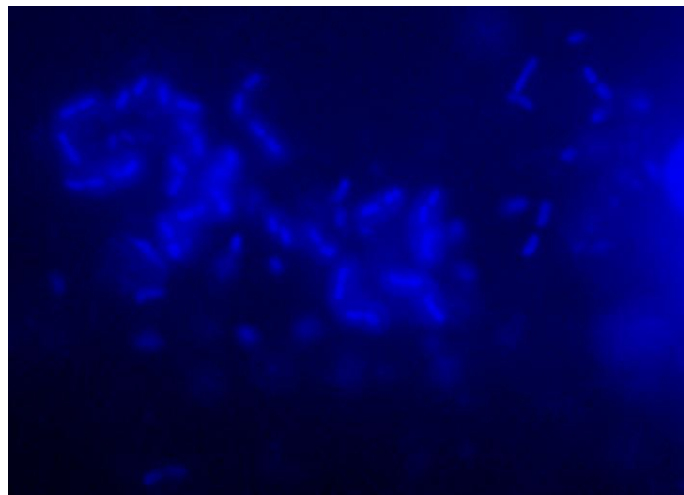
[Zadejte text.]



Obrázek 14: *P. aeruginosa* zobrazena pomocí TEM, rozdílné barvení kmene 143S, S forma (vlevo) a mukózní formy 142M (v pravo) obsahuje v mezibuněčném prostoru vláknité útvary. Mohlo by se jednat o EPS. Měřítko 200 nm. (foto: Uhlík, Mošničková)

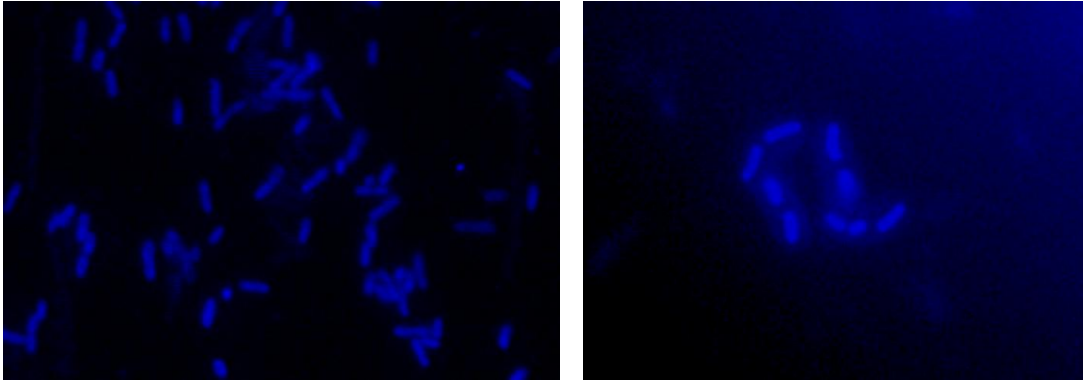
8.1.3 Imunofluorescenční mikroskopie

Barvení calcofluorem (*Calcofluor White Stain*)



Obrázek15 : Sputum barvené calcofluorem, na obrázku je zachycena kolonie bakterií, která je pravděpodobně obklopena nějakým druhem extracelulárních látek (foto: Chrenková, Mošničková)

[Zadejte text.]



Obrázek 16: *P. aeruginosa* zobrazena pomocí barvení calcofluorem 143S (vlevo) a mukózní forma 142M (vpravo). Mukózní buňky mají kolem sebe světlou vrstvu, mohlo by se jednat o nějaký druh extracelulárních látek (foto: Chrenková, Mošničková).

8.2 Kultivační průkaz *P. aeruginosa* s různým morfotypem

8.2.1 Fenotypová identifikace

Kultura disociující na hladký (S) a mukózní (M) fenotyp (Obrázek 17) pocházela z jednoho vzorku sputa pacienta s CF. Identifikace obou izolátů 142M a 143S byla provedena pomocí hmotnostní spektrometrie. Druhová identifikace byla v obou případech *P. aeruginosa* se skórem vyšším než 2,2, což je hranice deklarovaná pro spolehlivou identifikaci.

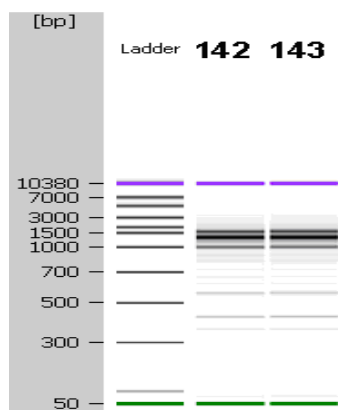


Obrázek 17: Hladké kolonie kmene 143 S tvořící zelenomodrý pigment (vlevo) a mukózní kolonie kmene 142 M izolované ze sputa jednoho pacienta (vpravo) z jednoho vzorku.

[Zadejte text.]

8.2.2 Klonální analýza

Klonální analýza byla provedena pomocí RAPD typizace v laboratoři mého konzultanta MUDr. Pavla Dřevínka, PhD.



Obrázek 18: Klinické izoláty 142M a 143S (obr. 142 a 143) sdíleli stejný profil a byly tudíž izogenní, tzn. patřily ke stejnému klonu (kmenu).

8.3 Stanovení citlivosti k antibiotikům

8.3.1 Stanovení citlivosti k antibiotikům diskovou difuzní metodou

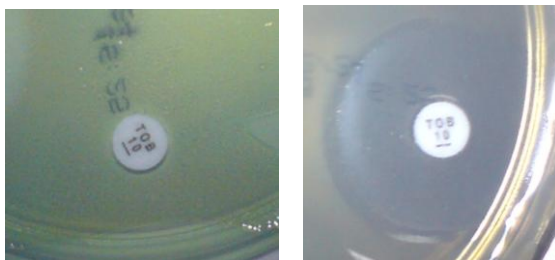
Tabulka 4 znázorňuje naměřené velikosti inhibičních zón (mm) pro jednotlivá antibiotika a analyzované izoláty. Naměřené velikosti inhibičních zón byly srovnány s hodnotami pro citlivé kmeny (viz Metody 7.4.1). Antibiotika, vůči kterým je vyšetřovaný izolát rezistentní, jsou zvýrazněny žlutě. Mukózní izoláty jsou značeny M a izoláty s hladkým fenotypem S. U mukózního izolátu 142M jsme v jednom případě připravili inokulum pouze z buněk kmene 142M (142M buňky). Chtěli jsme porovnat, zda má původní polymerová matrice vliv na testování citlivosti.

	CT	CN	NET	TOB	TZP	CAZ	AK	CIP	OFX	FEP	SCF	IMI	MEM
142M buňky	19	18	20	24	40	26	20	25	17	28	25	30	32
142M	18	18	20	23	38	34	21	28	17	30	23	30	32
143S	15	6	6	6	34	27	6	29	18	18	26	30	40

Tabulka 4: Velikosti inhibičních zón (mm) při testování citlivosti diskovou difuzní metodou pro izoláty *P. aeruginosa*. Antibiotika, ke kterým je vyšetřovaný kmen rezistentní jsou zvýrazněna žlutě.

[Zadejte text.]

Diskovou difuzní metodou jsme stanovili, že mukózní izolát 142M je k aminoglykosydovým antibiotikům (gentamicin, netilmicin, tobramycin, amikacin) citlivý. Zatím co izolát 143S je k těmto aminoglykosydům rezistentní.



Obrázek 19: Výsledek testování citlivosti izolátu 143S s hladkým fenotypem (vlevo) a mukózního izolátu 142M (vpravo) k aminoglykosidovému antibiotiku tobramycinu. Kmen 143S je rezistentní, zatím co mukózní kmen 142M je citlivý.

8.3.2 Stanovení minimální inhibiční koncentrace antibiotik (MIC)

Diluční metoda:

Naměřené hodnoty MIC pro jednotlivá antibiotika jsou uvedena v Tabulce 5. Hodnoty byly měřeny po jednodenní a tří denní. Antibiotika, vůči kterým je vyšetřovaný izolát rezistentní, jsou zvýrazněny žlutě. Mukózní izoláty jsou značeny M a izoláty s hladkým fenotypem S. U mukózního izolátu 142M jsme odečítali hodnoty MIC pro všechna antibiotika po inkubaci 1 den a 2 dny. U izolátu 143S jsme odečítali hodnoty MIC pro všechna antibiotika po inkubaci 1 den a pro vybraná antibiotika po inkubaci 3 dny.

[Zadejte text.]

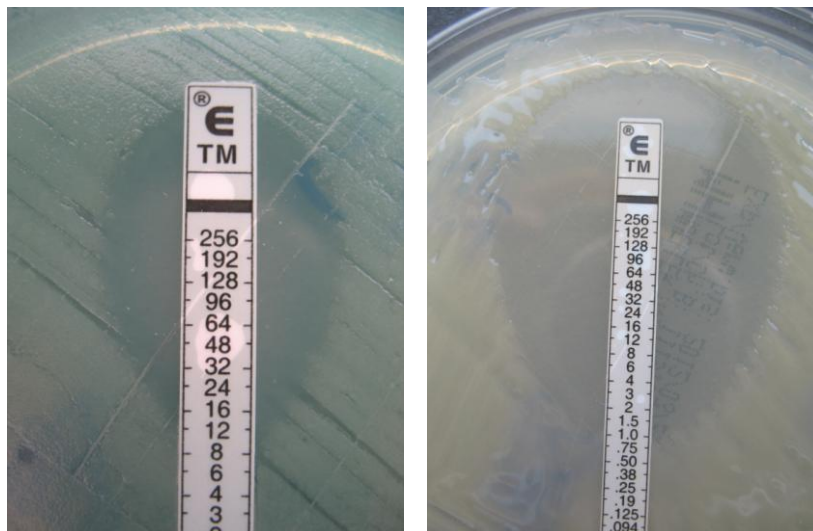
	142M	143S	142M	143S	Hranice rezistence
ATB	Kultivace 3dny		Kultivace 1 den		
AMP	>64		>64	16	4
AMS	16		>64	2	8
CZL	>64		>64	>64	4
CRX	>64		>64	32	4
CXT	>64		>64	8	4
GEN	2	16	1	8	4
COT	64		32	32	32
COL	0,25		0,5	0,25	4
OXO	>64		>64	16	8
OFL	8		4	0,25	2
TET	>16		>16	16	2
AZT	>16		>16	1	8
PIP	32		16	8	16
PIP/PPT	64		16	4	16
CPR	32		8	2	8
CTX	8		2	2	4
CTZ	4		1	4	4
CPM	16		8	>16	4
CPS	32		4	2	8
MER	8		1	0,25	4
CIP	16		4	0,25	1
TIG	>16		8	8	1
TOB	2	32	0,5	32	4
AMI	16	32	16	>32	8

Tabulka 5: Naměřené hodnoty MIC pro kmeny 142M a 143S po inkubaci 1 den a 3 dny. Kmeny jsou rezistentní pro antibiotika zvýrazněná žlutě. Hodnoty antibiotik jsou uvedeny v µg/ml

[Zadejte text.]

Etest:

Minimální inhibiční koncentrace tobramycinu byla u kmene 142M 1,0 $\mu\text{g/l}$ a u kmene 143S 12 $\mu\text{g/l}$ (Obrázek 20)



Obrázek 20: Výsledek testování kmene s hladkým fenotypem 143S (vlevo) a mukózního kmene 142M (vpravo) k tobramycinu. Z velikosti inhibiční zóny je zřejmé, že kmen 143S je k tobramycinu rezistentní na rozdíl od kmene 142M (vpravo)

9 Diskuze

Studie se zabývá problematikou tvorby biofilmu *P. aeruginosa* u pacientů s cystickou fibrózou. Tito pacienti v důsledku dědičné mutace genu CFTR trpí poruchou chloridového kanálu, což má za následek tvorbu vazkého hlenu ve žlázách s vnitřní sekrecí. Tento hlen se tvoří i v plicích pacientů s CF, odkud je obtížně odstraňován. Plicní parenchym těchto pacientů postrádá některé obranné mechanismy a je tak snadněji kolonizován různými patogeny, mezi ně patří i *P. aeruginosa*. Pokud dojde ke kolonizaci plic *P. aeruginosa*, je třeba neprodleně zahájit léčbu pomocí ATB.

Studované klinické izoláty *P. aeruginosa* s rozdílným fenotypem pocházející ze stejného vzorku pacienta s CF. Izoláty byly identifikovány pomocí hmotnostní spektrometrie (MALDI-TOF) a typizovány pomocí RAPD PCR, která prokázala že jsou isogenní, tzn. že jde o identický klon (kmen).

[Zadejte text.]

V případě tvorby biofilmu *in vivo* je možné kultivačně prokázat mukózní kmen *P. aeruginosa*. Pomocí světelné mikroskopie lze u mukózních izolátů vhodným barvením pozorovat projasnění kolem buněk *P. aeruginosa*, toto projasnění by mohlo být způsobeno přítomností extracelulární hmoty (EPS) produkované buňkami *P. aeruginosa*. Toto projasnění v bezprostřední blízkosti bakteriálních buněk jsme pozorovali při barvení preparátu dle Grama, karbolfuchsinem, karbolfuchsinem ale i tuží (vis. kapitola 8.1.1).

Při barvení calcofluorem jsme pozorovali podobný efekt jako ve světelné mikroskopii. Buňky mukózní formy *P. aeruginosa* byly obklopeny extracelulární hmotou, která podle konzultace s profesorem Hoibym (*Department of Medical Microbiology, Righospitalet, Kodaň*) přímo souvisí s tvorbou biofilmu *in vivo*. Rozdíly mezi mukózním kmenem a hladkým kmenem nebyly tak výrazné. Ale při barvení spůta tohoto pacienta s chronickou infekcí *P. aeruginosa* se biofilm a bakteriální buňky v něm calcofluorem výrazně obarvily. Limitací této metody je krátká doba, za kterou se intenzita fluorochromu sníží natolik, že nadále neumožňuje kvalitní pozorování struktury biofilmu. Metoda je vhodná pro průkaz biofilmu přímo ve sputech chronických pacientů s CF pouze v případě provedení pozorování zkušeným mikrobiologem.

Elektronová mikroskopie se běžně pro průkaz biofilmu nepoužívá. Z důvodu úzké spolupráce s Ústavem histologie a embryologie jsme se rozhodli využít metodu TEM pro průkaz extracelulárních polysacharidů (EPS) v kultuře mukózního kmene (142M) a porovnat ho s kmenem rostoucím v S formě (143S) od téhož pacienta. Ke zpracování vzorků byla použita originální metoda zalévání bakteriálních buněk do speciální agarózy s nízkým teplotou rozpouštění, kdy nedocházelo k teplotní destrukci buněk. Tato metoda se však neosvědčila pro přípravu vzorků na rozdíl od metody suspenzních buněk, která posloužila k přípravě preparátu, kde bylo možné sledovat u mukózního kmene rovněž vnější struktury a šlo tudíž pravděpodobně o EPS.

Mukózní izolát (142M) byl k aminoglykosidům citlivý na rozdíl od izolátu, který rostl v S formě. I když jde o tentýž kmen, rozdíly v citlivosti jsou překvapující. Literatura uvádí, že mukózní izoláty jsou více rezistentní k antibiotikům než izoláty s S fenotypem. Naše situace byla ale zcela opačná. Geny aminoglykosidové rezistence u našich izolátů ani jiné mechanismy rezistence jsme dosud nestudovali a budou předmětem dalšího studia.

[Zadejte text.]

Rešerše literatury pro stanovení citlivosti biofilmu k ATB poslouží k zavedení speciální metody (*biofilm susceptibility assay*). Biofilm narostlý ve speciální destičce se vystaví účinku ATB, jejichž účinek (BIC) se stanovuje inhibicí růstu v tekutém kultivačním médiu. Metoda je vhodná rovněž k testování kombinace antibiotik, které se běžně netestují. Je vhodná zejména pro pacienty s CF.

10 Závěr

Průkaz biofilmu *P. aeruginosa* přímo v klinickém materiálu pacienta s CF nebo v bakteriální kultuře byl proveden pomocí světelné, imunofluorescenční a elektronové mikroskopie. Při testování citlivosti kmene, který disocioval na kolonie mukózního (M) a hladkého (S) fenotypu byla paradoxně prokázána rezistence k aminoglykosidům u kmene s S fenotypem. Mechanismus této rezistence není známý a bude předmětem dalšího studia. Byla provedena rešerše literatury pro stanovení citlivosti biofilmu k ATB pomocí speciální metody (*biofilm susceptibility assay*), která je základem pro zavedení této metody u našich pacientů s CF.

11 Referenční seznam

1. SCHINDLER, Jiří. *Ze života bakterií*. Vyd. 1. Praha: Academia, 2008, 143 s. ISBN 978-80-200-1666-9.
2. http://www.medscape.com/viewarticle/441355_6 7.12.2011
3. HOIBY, N., et al. *Pseudomonas aeruginosa and the in vitro and in vivo biofilm mode growth*. *Microbes and infections*. 2001, vol.3, 1, s. 23-35.
4. FLEMMING, H.-C., T. R. NEU a D. J. WOZNIAK. The EPS Matrix: The "House of Biofilm Cells". *Journal of Bacteriology*. 2007-10-31, roč. 189, č. 22, s. 7945-7947. ISSN 0021-9193. DOI: 10.1128/JB.00858-07. Dostupné z: <http://jb.asm.org/cgi/doi/10.1128/JB.00858-07>
5. FLEMMING, H.-C., T. R. NEU a D. J. WOZNIAK. The EPS Matrix: The "House of Biofilm Cells". *Journal of Bacteriology*. 2007-10-31, roč. 189, č. 22, s. 7945-7947. ISSN 0021-9193. DOI: 10.1128/JB.00858-07. Dostupné z: <http://jb.asm.org/cgi/doi/10.1128/JB.00858-07>
6. RULÍK, Martin. *Mikrobiální biofilmy*. 1. vyd. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2011, 447 s. ISBN 978-80-244-2747-8.
7. GREENWOOD, David, SLACK, Richard C. B., PEUTHERER, Richard C. B.: *Lékařská mikrobiologie : přehled infekčních onemocnění: patogeneze, imunita, laboratorní diagnostika a epidemiologie* . Praha : Grada , 1999 . 686 s. ISBN 80-7169-365-0.
8. SCHINDLER, Jiří: *Mikrobiologie : pro studenty zdravotnických oborů*, 1. vyd. . Praha : Grada Publishing, 2010 . 223 s. ISBN 978-80-247-3170-4.
9. SABATH, L.D.: *Pseudomonas aeruginosa : the organism, diseases it causes, and their treatment* . Bern : Huber , c1980 . 264 s. . ISBN 3-456-80981-6.
10. <http://www.genvia.cz/dokumenty/fibroza.pdf> 26.3. 2012

[Zadejte text.]

11. VOTAVA, Miroslav: *Lékařská mikrobiologie* . Brno : Masarykova univerzita , 2000 . 309 s. . ISBN 80-210-2272-8.
12. http://old.lf3.cuni.cz/ustavy/mikrobiologie/rep/antib_8.htm 1.4.2012
13. http://mathbio.colorado.edu/mediawiki/index.php/MBW:Role_of_Biofilm_Matrix_in_Structural_Development 10.4. 2012
14. <http://www.vesmir.cz/clanek/mikrobiaalni-biofilm> 10.4. 2012
15. MOSKOWITZ, et al. Clinically Feasible Biofilm Susceptibility Assay for Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from Patients with Cystic Fibrosis. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*. 2004, roč. 42, č. 5, s. 1915-1922. DOI: 10.1128/JCM.42.5.1915-1922.2004. Dostupné z: <http://jcm.asm.org/content/42/5/1915>
16. VOTAVA, Miroslav. *Lékařská mikrobiologie speciální* . Brno : Neptun , 2003 . 495 s. . ISBN 80-902896-6-5.
17. <http://www.sanglab.cz/pro-lekare/laboratorni-prirucka/c---manual-pro-odbery-primarnich-vzorku/c-8-odber-vzorku/odber-sputa/> 12.4. 2012
18. *Serious infections in the intensive care unit : Pseudomonas aeruginosa and Acinetobacter baumannii* . Chicago : University of Chicago Press , 2006 . 41-121 s. . (Clinical infectious diseases, vol. 43, suppl. 2, September 2006) .
19. 19 HAVLIŠ, Jan *Hmotnostní spektrometrie MALDI TOF*. *Vesmír: přírodovědecký časopis*. Praha: Etna, 1999, roč. 78, č. 8, s. 448. ISSN 1214-4029.
20. 20 ZÁBRANSKÁ, Lenka. *Charakterizace fenotypu a genotypu kmenů Staphylococcus aureus a Pseudomonas aeruginosa od pacientů s cystickou fibrózou*. Praha: Univerzita Karlova, 2. lékařská fakulta, 2011. 58 s.