

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

2. LÉKAŘSKÁ FAKULTA

Ústav lékařské mikrobiologie

Romana Šulcová

**Zavedení diagnostiky nových bakteriálních
patogenů *Pandoraea* a *Inquilinus* izolovaných
od pacientů s cystickou fibrózou a stanovení
jejich citlivosti k antibiotikům**

Bakalářská práce

Praha 2012

Autor práce: **Romana Šulcová**

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

Konzultant práce: **Mgr. Jan Tkadlec**

Oponent práce: **MUDr. Otakar Nyč, Ph.D.**

Datum obhajoby: **2012**

Bibliografický záznam

Šulcová, Romana. *Zavedení diagnostiky nových bakteriálních patogenů Pandorea a Inquilinus izolovaných od pacientů s cystickou fibrózou a stanovení jejich citlivosti k antibiotikům*. Praha: Univerzita Karlova, 2. lékařská fakulta, 2012. 71 s. Vedoucí bakalářské práce MVDr. Oto Melter, Ph.D. , Konzultant Mgr. Jan Tkadlec

Anotace

Cystická fibróza patří mezi nejčastěji se vyskytující autozomálně recesivně dědičné onemocnění. V dnešní době mají lidé s tímto onemocněním, díky včasné diagnostice a léčbě dalších přidružených příznaků, lepší prognózu než před několika lety. CF je onemocnění, které je podmíněno mutací genu CFTR (*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*) na chromozomu 7. Defektem proteinu CFTR dochází k poruše resorpce a sekrece elektrolytů v chloridovém kanálu a tím k tvorbě viskózního hlenu v plicích, který je hlavní příčinou chronických bakteriálních infekcí dolních dýchacích cest. Mezi nejčastějšími patogeny, které způsobují závažné infekce dýchacích cest u pacientů s CF patří: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* komplex. U pacientů s CF se dnes prokazují v dýchacích cestách nové bakteriální druhy, jejichž biologické vlastnosti nejsou dosud známy a jejich role v etiopatogenezi onemocnění a epidemiologii nejsou přesně známy. K jejich detekci se v dnešní době používají specifické metody amplifikace a nebo sekvenace genu pro 16S rRNA. Nově se objevující patogeny patří například do rodu *Pandora* a *Inquilinus*, které řadíme do skupiny gramnegativních nefermentujících tyčinek, a proto jsou často zaměňovány za jiné jim fenotypově podobné bakteriální druhy, jejichž výskyt je u CF pacientů znám. V experimentální části práce jsem zavedla selektivní kultivaci a genotypové metody s použitím již známých primerů a zároveň navrhla originální primery pro rodovou a druhovou identifikaci referenčních kmenů a klinických izolátů *Pandorea* sp. a *Inquilinus* sp., což umožní jejich specifický průkaz u pacientů s CF.

Klíčová slova

rod *Pandora*, rod *Inquilinus*, *Burkholderia cepacia*, cystická fibróza, citlivost k antibiotikům, fenotyp, genotyp, selektivní průkaz

Annotation

Cystic fibrosis is one of the most common autosomal recessive hereditary disease. Nowadays, people, with this disease, because early diagnosis and treatment of other associated symptoms a better prognosis than a few years ago. CF is a disease that is subject to mutation of the CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator) on the seventh chromosome. Defect in the CFTR protein leads to failure of resorption and secretion of electrolytes chloride channel and thereby creating viscous mucus in the lungs, which is the main cause of chronic bacterial infections of the lower airways. Among the most common pathogens causing severe respiratory infections in CF patients include: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* complex. In patients with CF is now showing in the airways of new bacterial species whose biological properties are not yet known and their role in the etiopathogenesis of the disease and epidemiology are not exactly known. In these days their detection is used by specific amplification methods, or sequencing of the 16S rRNA gene. Emerging pathogens such as the genus *Pandora* and *Inguilinus* that belong non-fermenting Gram-negative groups in the rods, and therefore are often exchange for other bacterial species that are phenotypically similar to them. In the experimental part I introduced selective cultivation and genotypic methods using primers already known and proposed the original primers for the identification of genus and species reference strains and clinical isolates *Pandorea* sp. and *Inguilinus* sp., allowing a specific detection in patients with CF.

Keywords

genus *Pandora*, genus *Inguilinus*, *Burkholderia cepacia*, cystic fibrosis, sensitivity to antibiotics, fenotype, genotype, selective detection

Prohlášení

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

V Praze

Romana Šulcová

Poděkování

V první řadě bych chtěla poděkovat především svému školiteli MVDr. Otovi Melterovi, Ph.D. a konzultantovi Mgr. Janu Tkadlecovi za ochotu, trpělivost, cenné a odborné rady při zpracování mé bakalářské práce.

Dále děkuji za pomoc při zpracování experimentální části zaměstnancům Ústavu lékařské mikrobiologie. V neposlední řadě děkuji také své rodině a přátelům za podporu při mém studiu.

Obsah

1	SEZNAM ZKRATEK.....	10
	ÚVOD.....	11
2	CYSTICKÁ FIBRÓZA.....	12
2.1	HISTORIE.....	12
2.1.1	<i>Historie cystické fibrózy v zahraničí.....</i>	<i>12</i>
2.1.2	<i>Historie cystické fibrózy v České republice.....</i>	<i>12</i>
2.1.3	<i>Patogeneze onemocnění CF.....</i>	<i>12</i>
2.1.4	<i>Mutace v genu CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator) u pacientů s cystickou fibrózou.....</i>	<i>13</i>
2.2	DIAGNÓZA CYSTICKÉ FIBRÓZY.....	14
2.2.1	<i>Klinické projevy onemocnění CF.....</i>	<i>14</i>
2.2.1.1	<i>Trávicí ústrojí (Gastrointestinální trakt- GIT).....</i>	<i>14</i>
2.2.1.2	<i>Reprodukční systém.....</i>	<i>14</i>
2.2.1.3	<i>Potní žlázy.....</i>	<i>14</i>
2.2.1.4	<i>Dýchací systém.....</i>	<i>15</i>
2.3	VÝZNAMNÉ PATOGENY U PACIENTŮ S CF.....	16
2.3.1	<i>Staphylococcus aureus.....</i>	<i>16</i>
2.3.2	<i>Pseudomonas aeruginosa.....</i>	<i>17</i>
2.3.3	<i>Burkholderia cepacia komplex.....</i>	<i>17</i>
3	ROD PANDORAEA.....	19
3.1	PŮVOD.....	19
3.2	MORFOLOGIE BUNĚK A MIKROSKOPIE.....	19
3.3	RŮSTOVÉ, KULTIVAČNÍ A BIOCHEMICKÉ VLASTNOSTI.....	20
3.3.1	<i>Růstové, kultivační a biochemické vlastnosti rodu Pandoraea.....</i>	<i>20</i>
3.3.2	<i>Pandoraea apista.....</i>	<i>20</i>
3.3.3	<i>Pandoraea pulmonicola.....</i>	<i>20</i>
3.3.4	<i>Pandoraea pnomenus.....</i>	<i>21</i>
3.3.5	<i>Pandoraea sputorum.....</i>	<i>21</i>
3.4	IDENTIFIKACE FENOTYPOVÁ A GENOTYPOVÁ.....	22
4	ROD INQUILINUS.....	24
4.1	PŮVOD.....	24
4.2	MORFOLOGIE BUNĚK A MIKROSKOPIE.....	24
4.3	RŮSTOVÉ, KULTIVAČNÍ A BIOCHEMICKÉ VLASTNOSTI RODU <i>INQUILINUS</i>	25
4.3.1	<i>Inquilinus limosus.....</i>	<i>25</i>
4.4	IDENTIFIKACE FENOTYPOVÁ A GENOTYPOVÁ.....	26
5	CÍL.....	27
6	MATERIÁL.....	28
6.1	BAKTERIÁLNÍ KMENY.....	28
6.1.1	<i>Rod Pandoraea.....</i>	<i>28</i>
6.1.2	<i>Inquilinus limosus.....</i>	<i>29</i>
6.1.3	<i>Burkholderia cepacia.....</i>	<i>29</i>
6.2	KULTIVAČNÍ MEDIA.....	29
6.3	ANTIBIOTIKA.....	30
6.3.1	<i>Antibiotika používaná na diskový difúzní test.....</i>	<i>30</i>
6.3.2	<i>Antibiotika obsažená v mikrotitrační destičce pro stanovení minimální inhibiční koncentrace.....</i>	<i>30</i>
6.4	KOMERČNÍ SADY.....	31
6.5	ROZTOKY.....	32

6.5.1	Rotoky a chemikálie pro provedení elektroforézy.....	32
6.5.2	Roztoky a chemikálie pro Gramovo barvení.....	32
6.5.3	Chemikálie pro provedení katalázového testu.....	33
6.6	PRIMERY PRO ROD <i>PANDORAEA</i> A <i>INQUILINUS</i>	33
6.6.1	Výběr primerů pro genotypovou identifikaci.....	34
7	METODY	35
7.1	ODBĚR SPUTA.....	35
7.2	FENOTYPOVÁ IDENTIFIKACE.....	35
7.2.1	Kultivace.....	35
7.2.2	Gramovo barvení.....	36
7.2.2.1	Příprava preparátu.....	35
7.2.2.2	Vlastní barvení.....	35
7.2.2.3	Výsledek barvení a vlastní mikroskopování preparátu.....	35
7.2.3	Selektivní průkaz rodu <i>Pandoraea</i>	37
7.2.3.1	Selektivní průkaz rodu <i>Pandoraea</i> s použitím rodu <i>Burkholderia cepacia</i>	36
7.2.3.2	Selektivní průkaz rodu <i>Pandoraea</i> z klinického materiálu.....	37
7.2.4	Biochemické vlastnosti a identifikace.....	39
7.2.4.1	Průkaz oxidázy- oxidázový test.....	38
7.2.4.2	Průkaz katalázy- katalázový test.....	38
7.2.5	MALDI- TOF MS (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry).....	39
7.2.5.1	Princip MALDI- TOF MS.....	39
7.3	GENOTYPOVÁ IDENTIFIKACE.....	41
7.3.1	Izolace bakteriální DNA.....	41
7.3.2	Polymerázová řetězová reakce (PCR).....	42
7.3.2.1	Princip polymerázové řetězové reakce (PCR).....	41
7.3.2.2	Postup provedení PCR.....	42
7.3.3	Elektroforéza.....	43
7.3.3.1	Princip elektroforézy.....	42
7.3.3.2	Provedení elektroforézy.....	42
7.4	STANOVENÍ CITLIVOSTI K ANTIBIOTIKŮM.....	44
7.4.1	Stanovení citlivosti k antibiotikům difúzním diskovým testem.....	45
7.4.1.1	Princip metody.....	44
7.4.1.2	Postup při provedení difúzního diskového testu ke stanovení citlivosti k antibiotikům.....	44
7.4.2	Stanovení minimální inhibiční koncentrace antibiotik (MIC).....	46
7.4.2.2	Provedení testu ke stanovení minimální inhibiční koncentrace antibiotik (MIC).....	46
8	VÝSLEDKY	48
8.1	MIKROSKOPICKÝ PRŮKAZ.....	48
8.1.1	Mikroskopický průkaz rodu <i>Pandoraea</i>	48
8.1.2	Mikroskopický průkaz rodu <i>Inquilingus</i>	49
8.2	KULTIVAČNÍ PRŮKAZ.....	50
8.2.1	Kultivační průkaz - <i>Pandoraea</i>	50
8.2.2	Kultivační průkaz - <i>Inquilingus</i>	53
8.3	PRŮKAZ OXIDÁZY A KATALÁZY TESTU.....	53
8.3.1	Průkaz oxidázy a katalázy - <i>Pandoraea</i>	53
8.3.2	Průkaz oxidázy a katalázy- <i>Inquilingus</i>	54
8.4	SELEKTIVNÍ PRŮKAZ RODU <i>PANDORAEA</i>	54
8.4.1	Selektivní průkaz kmene <i>Pandoraea apista</i> s použitím kmene <i>Burkholderia cepacia</i>	54
8.4.2	Selektivní průkaz kmene <i>Pandoraea apista</i> z klinického materiálu.....	56
8.5	GENOTYPOVÁ IDENTIFIKACE.....	57
8.5.1	Genotypová identifikace rodu <i>Pandoraea</i>	57
8.5.2	Genotypová identifikace rodu <i>Inquilingus</i>	58

8.6	STANOVENÍ CITLIVOSTI K ANTIBIOTIKŮM	59
8.6.1	<i>Stanovení citlivosti k antibiotikům difúzním diskovým testem – rod Pandoraea</i>	<i>59</i>
8.6.2	<i>Stanovení citlivosti k antibiotikům metodou minimální inhibiční koncentrace (MIC) – Pandoraea apista</i>	<i>61</i>
8.6.3	<i>Stanovení citlivosti k antibiotikům difúzním diskovým testem – Inquilinus limosus</i>	<i>62</i>
9	DISKUZE	64
10	ZÁVĚR.....	67
11	REFERENČNÍ SEZNAM.....	68

1 Seznam zkratek

2.LFUK	2. lékařská fakulta Univerzity Karlovy
µm	mikrometr
ARDRA	<i>Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis</i>
BC	<i>Burkholderia cepacia</i>
BCCM	<i>Bacteria Collection, Universiteit Gent</i>
CCF	Centrum cystické fibrózy
CF	cystická fibróza
CFTR	<i>Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator</i>
DNA	deoxyribonukleová kyselina
GIT	Gastrointestinální trakt
FN	Fakultní nemocnice
g	gram
LGM	<i>Laboratorium voor Mikrobiologie, Gent, Belgium</i>
MALDI-TOF MS	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry</i>
MF	McFarland
mmol/l	milimol na litr
MIC	minimální inhibiční koncentrace
MH	Mueller- Hintonův agar
NaCl	chlorid sodný
pb	<i>base pairs</i> (velikost v nukleotidech)
PCR	polymerázová řetězová reakce
RL	<i>Respiratory Specimen Lysis Reagent</i>
RN	<i>Respiratory Specimen Neutralization Reagent</i>
RW	<i>Respiratory Specimen Wash Solution</i>
<i>RSP kit</i>	<i>Respiratory Speciment Preparation kit</i>
UV	ultrafialová záření
V	volt

ÚVOD

Téma své bakalářské práce jsme si vybrala, jelikož cystická fibróza (CF) neboli mukoviscidóza je závažné dědičné autozomálně recesivní onemocnění. Incidence této nemoci je 1 : 2736 novorozenců. Cystická fibróza je způsobena mutací genu *CFTR* (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator) na chromozomu 7, neboli na chromozomu cystické fibrózy. Mezi nejčastější mutace v tomto genu patří F508del, jejíž výskyt ve světové populaci se odhaduje na 66% u všech diagnostikovaných pacientů s CF. Poruchou funkce proteinu kódovaného *CFTR* genem dochází k snížené sekreci chloridových iontů a zvýšené resorpci sodíkových iontů tzn., že mutací v genu *CFTR* dochází k defektu sekretoricko-resorpčnímu, který vede k poruše transportů elektrolytů. Dříve se díky fibrotickým změnám na pankreatu nazývalo toto onemocnění cystická fibróza pankreatu. V současné době se zjistilo, že dochází také k závažným změnám ve tkáni respiračního traktu neboli, že dochází k fibrotizaci plic. Fyziologickým projevem CF je také tvorba vazkého hlenu, který zhoršuje mechanické očišťování dolních cest dýchacích. Tento viskózní hlen tvoří optimální prostředí, kde dochází k ulpívání a množení patogenních a oportunně patogenních mikroorganismů v dolních cestách dýchacích. V důsledku množení patogenních organismů dochází ke vzniku infekcí, z nichž některé mohou být pro oslabeného pacienta s CF smrtelné. Mezi první patogeny kolonizující respirační ústrojí nemocných s cystickou fibrózou patří *Staphylococcus aureus*, ve většině případů stafylokokové infekci předchází infekce virová. Jako další patogen se u nemocných s CF a u pacientů, kteří trpí deficitem imunitního systému, objevuje *Pseudomonas aeruginosa*. U nemocných můžeme detekovat z klinického materiálu, nejčastěji ze sputa, i mnoho jiných patogenních mikroorganismů, jako jsou např.: *Stenotrophomonas maltophilia*, *Burkholderia cepacia* komplex a další. Mezi původce mykotických infekcí můžeme řadit kvasinku *Candida albicans* a plíseň *Aspergillus fumigatus*. Čím dál častěji se u dětských a dospělých pacientů nemocných cystickou fibrózou vyskytují také nové patogenní kmeny z rodů jako jsou například *Pandora* a *Inqulinus*, které zatím nejsou běžně diagnostikovány. Tyto patogeny se stávají původci mnoha závažných onemocnění a podmiňují vznik menších epidemií. Praktickou část bakalářské práce jsem zaměřila na zavedení nových diagnostických postupů, které by pomohly usnadnit určení a včasný průkaz těchto patogenů a následně jejich léčbu antibiotiky.

2 Cystická fibróza

2.1 Historie

2.1.1 Historie cystické fibrózy v zahraničí

V roce 1938 použila americká patoložka Dorothy Andersenová označení cystická fibróza (CF) pankreatu. Prvně byla cystická fibróza v zahraničí u žijícího pacienta diagnostikována pomocí klinických příznaků plicního onemocnění a vyšetření pankreatické šťávy. Právě toto vyšetření pankreatické šťávy prokázalo nefunkčnost pankreatu. Tento pacient se v důsledku nedostatku adekvátní léčby dožil necelých 11 let. S. Faber upozornil na charakter hlenu a také na to, že jediným poškozeným orgánem není pankreas, ale hlavně plíce, proto zavedl název mukoviscidóza. Mezi velmi důležité objevy v diagnostice cystické fibrózy patří průkaz potní anomálie. Potní anomálie byla vyšetřována pilokarpinovou iontoforézou podle Gibsona a Cooka. Pilokarpionová iontoforéza je metoda, při níž dochází k stimulaci potních žláz. Rok 1946 byl dalším důležitým mezníkem ve výzkumu cystické fibrózy, jelikož se potvrdil autozomálně recesivní charakter dědičnosti choroby. V roce 1957 se nově zavedl postup intenzivní léčby, která v dnešní době slouží jako základ klasické léčby [1].

2.1.2 Historie cystické fibrózy v České republice

Roku 1946 byla na II. dětské klinice v Praze diagnostikována cystická fibróza u prvního pacienta. Na začátku 60. let 20. století bylo poprvé v praxi využito vyšetření chloridových iontů v potu, pomocí metody pilokarpinové iontoforézy. Tímto diagnostickým postupem došlo k odhalení mnoha nových pacientů nemocných cystickou fibrózou. Ke konci 80. let 20. století začalo zakládání nových specializovaných center pro léčbu cystické fibrózy. V roce 1998 se u nemocných s cystickou fibrózou do léčebného postupu zařadila i transplantace plic [1].

2.1.3 Patogeneze onemocnění CF

Cystická fibróza je autozomálně recesivní dědičné onemocnění. CF není jediné označení pro toto onemocnění, v zahraničí se můžeme setkat i s názvem mukoviscidóza,

tento název upozorňuje na hustotu hlenu, který se tvoří v plicích a je pro tuto chorobu typický [2]. CF je způsobena mutací v genu *CFTR* (viz kap. 1.2.1.) Protein CFTR je umístěn v apikální oblasti epitelálních buněk u zdravých osob, kde umožňuje průchod chloridových iontů, neboli buněčnou membránou [1]. U pacientů s cystickou fibrózou je díky mutaci průchod chloridovým kanálem omezen a tím nedochází k průchodu chloridových iontů. V plicích se chloridové ionty nevyklučují, ale naopak se hromadí, dále dochází k nadměrné absorpci sodíku a vody. Z důvodu nadměrné absorpce vody a sodíku z tekuté vrstvy buňky nedochází k mechanickému čištění epitelu v dolních cestách dýchacích. Díky tomuto mechanismu se začne tvořit zhuštěný hlen, který se hromadí v plicích.

CF je generalizované onemocnění tzn., že ke stejným změnám dochází i v jiných orgánech organismu, nikdy nepostihuje pouze jeden orgán. U 85 % pacientů s cystickou fibrózou nacházíme změny i na slinivce břišní. V pankreatu vzniká hustý hlen a dochází k dilataci pankreatických vývodů. Vazký hlen se začíná hromadit ve vývodech, v důsledku toho vznikne atrofie exokrinního žlázového parenchymu, neboli dochází k fibróze pankreatu [3].

Také v potních žlázách respektive ve vývodech potních žláz nalézáme protein CFTR, který má i zde svou úlohu [2]. V potních žlázách je jiný mechanismus účinku proteinu CFTR, chloridový kanál je sice u pacientů s CF pro chloridové ionty také neprůchodný, ale v opačném směru než je tomu v plicích. Na rozdíl od dýchacích cest, se protein CFTR v potních žlázách lokalizuje nejen v apikální, ale i v basální části buněk. Transport chloridových iontů je zde porušen ve směru z potu do buňky a ne naopak. Dopad této poruchy je takový, že v potu můžeme detekovat až 5x vyšší koncentraci chloridových iontů u nemocných CF, než je tomu u zdravých lidí [2]. Koncentrace chloridových iontů v potu je u dětských pacientů s CF do 60 mmol/l a u dospělých pacientů s CF do 70 mmol/l. U některých pacientů můžeme detekovat v potu také hraniční hodnoty chloridů v potu, což je 30 – 60 mmol/l, tyto hodnoty se vyskytují ve většině případů u pacientů s mírnějšími mutacemi v *CFTR* genu [1].

2.1.4 Mutace v genu *CFTR* (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator) u pacientů s cystickou fibrózou

V dnešní době je známo mnoho variant mutací v genu *CFTR*. *CFTR* gen slouží jako předloha, neboli genový podklad pro tvorbu proteinu CFTR. Mezi nejčastější mutace patří mutace F508del, kterou můžeme ve starších literaturách nacházet pod jejím starším

označením $\Delta F508$. Mutace F508del je označení pro mutaci asi 3pb v genu *CFTR*, která má za následek ztrátu fenylalaninu, který je lokalizován na pozici 508 proteinu *CFTR*. Tato mutace se vyskytuje celosvětově v 66% všech případů CF. Druhou nejčastější mutací v genu *CFTR* je G542X, podstatou jejího vzniku je nestabilní *CFTR*-mRNA, relativní četnost této mutace je 2,42% na celém světě.

Mezi další mutace, které se častěji vyskytují v genu *CFTR*, patří mutace v G551D, která způsobuje záměnu glycinu za aspartát v poloze 551. Tuto mutaci můžeme také obecně nazvat „missence“ mutace. Její relativní četnost na celém světě se pohybuje okolo 1,64%. Nepřítomnost mutace, která by potvrdila klinický obraz onemocnění, diagnózu cystické fibrózy nevylučuje [1].

2.2 Diagnóza cystické fibrózy

Diagnóza onemocnění CF musí být potvrzena včasné a hlavně také spolehlivě. Pokud není CF potvrzena co nejdříve, může dojít k mnoha komplikacím během následujících let a tím ke zhoršení prognózy pacienta. Aby bylo potvrzeno onemocnění CF, musí být splněna určitá kritéria pro diagnózu tohoto onemocnění. Mezi diagnostická kritéria patří potvrzení alespoň jednoho nebo více specifických příznaků onemocnění, rodinná anamnéza, tzn. zda-li se již v rodině vyskytlo nebo nevyskytlo onemocnění CF, nebo pozitivita novorozeneckého screeningu, který provádíme těsně po narození. V případě pozitivní rodinné anamnézy, by lékař či genetik měl myslet na potenciaální riziko pro další potomky v rodině. Důležitý v diagnóze onemocnění CF je laboratorní průkaz dysfunkce či atypické funkce proteinu a genu *CFTR*. K diagnóze dále využíváme přímé či nepřímé diagnostiky DNA [1].

2.2.1 Klinické projevy onemocnění CF

Klinické příznaky u nemocných CF jsou velmi odlišné. Někteří postižení mají dokonce abnormální průběh onemocnění, kdy se můžeme například setkat s hraniční nebo normální koncentrací chloridů v potu. U některých pacientů s onemocněním CF můžeme pozorovat i jednotlivé příznaky samostatně a ne jako soubor příznaků. Zvláštní pozornost by se měla věnovat bezpříznakovým případům, zvláště u rodin, kde se již dříve diagnóza CF vyskytla [1].

2.2.1.1. Trávicí ústrojí (Gastrointestinální trakt – GIT)

V trávicím ústrojí dochází nejčastěji k poruchám trávení, způsobeného nedostatečným vylučováním potřebných enzymů a kyseliny uhličité (bikarbonátu) z pankreatu. V důsledku poruchy trávení většina nemocných neprospívá [2]. Včasné odhalení poruchy zevní sekrece pankreatu je důležité pro další stanovení prognózy nemocného [1]. V kojeneckém věku nemusí docházet pokaždé k nedostatečnému vylučování enzymů, tento příznak se může projevit až v pozdějším věku pacienta. V některých případech dojde k projevu onemocnění okamžitě po narození a to vznikem mekoniového ilea, což je ucpání střev hlenovitou substancí. Mekoniového ileum se vyskytuje asi u 7 -10% pacientů [4]. Dalšími příznaky jsou opakované zvracení, poruchy růstu, plynatost, objemná stolice, která často zapáchá. Velmi časté jsou také poruchy slinivky břišní, mezi které patří diabetes melitus, pankreatitidy a poruchy zevní sekrece pankreatu. Ve střevu u kojenců vzniká již zmíněný mekoniový ileus, k dalším patologickým nálezům ve střevě řadíme výhřez konečníku, distální obstrukční syndrom a striktury střeva. V trávicím ústrojí u nemocného CF se vyskytuje i postižení jater, které může vést v některých případech až k cirhóze. Postižení žlučníku je charakteristické tvorbou žlučových konkrementů [1,2].

2.2.1.2. Reprodukční systém

U mužů s CF je velmi často diagnostikována neplodnost. Dále u mužů dochází k nesestoupení varlat a u chlapců k hydrokéle. Ženy postižené onemocněním CF mají m CF mají sníženou plodnost a malou pravděpodobnost otěhotnění, dále můžeme pozorovat opožděný sekundární vývoj. U žen, u kterých je diagnostikována plicní nedostatečnost společně s malnutricí se může vyskytnout amenorhea [2,4].

2.2.1.3. Potní žlázy

V důsledku dysfunkce proteinu CFTR, který je umístěn ve vývodech potních žláz dochází k poruše vstřebávání chloridových iontů a tím ke zvyšování iontů v potu. Zvýšené chloridové ionty v potu se využívají jako jeden z vyšetřovacích postupů vedoucích k diagnostice CF. Test na zvýšení chloridových iontů v potu – potní test [2].

2.2.1.4. Dýchací systém

V plicích dochází k tvorbě vazkého hlenu, který se z plic obtížně odstraňuje. Nemocní CF trpí velmi často opakujícími se a přetrvávajícími infekcemi plic, jelikož hustý hlen tvoří ideální prostředí pro množení a přežívání oportunně patogenních a patogenních bakterií. Tato onemocnění jsou příčinou zvýšené morbidity a mortality u nemocných s CF.

V důsledku těchto onemocnění dochází k poškozování plicního parenchymu, toto poškození je příčinou pulmonální insuficience. Těmto stavům lze předejít vhodnou prevencí infekcí, brzkou diagnostickou a adekvátní léčbou. Mezi typické příznaky u nemocných patří: dušnost, chronický nebo recidivující kašel, který může být zvlhčen hlenem nebo se může též projevovat jako suchý dráždivý kašel, sípot, ztížené dýchání, atypické astma, bolesti na hrudi a mnoho dalších. V dýchacích cestách dochází k opakovaným nebo chronickým bronchitidám, paranasitidám, pneumoniím a tvorbě nosních polypů [1,2,4,5].

Mezi původce onemocnění postihující dýchací cesty řadíme bakterie, viry a plísňe. Nečastějšími původci infekcí u pacientů s CF jsou: *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* komplex, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Achromobacter xylosoxidans*, netuberkulózní mykobakteria, *Aspergillus fumigatus* a *Candida albicans* [1].

2.3 Významné patogeny u pacientů s CF

2.3.1 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus patří mezi grampozitivní koky, které jsou uspořádané ve shlucích. Řazen je mezi nesporulující, nepohyblivé, neopouzdržené bakterie [6]. Tento mikrob je běžně nalézán jako složka mikroflóry sliznic dýchacího ústrojí a kůže. *S. aureus* je nejčastějším patogenem u pacientů s CF [7]. Přenos infekce *S. aureus* může probíhat přímou či nepřímou cestou a dále může být přenášen i jako kapénková infekce. Příčinou nákazy bývá zdravý člověk, tzn.: nosič, také je získáván jako nozokomiální patogen při pobytu v nemocnicích. Velmi častý je výskyt stejného kmene u členů v rodině. K manifestaci infekce, kterou způsobuje *S. aureus* ve většině případů dochází až po proběhlé infekci virové.

U pacientů s CF je tento patogen izolován jako první v dýchacích cestách. *S. aureus* způsobuje u malých dětí velmi závažné infekce plic, které mohou mít fatální následky[1].

2.3.2 *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa patří mezi gramnegativní, nesporulující, neopouzdřené bakterie, které jsou pohyblivé díky jednomu či dvěma polárním bičíkům [6]. *P. aeruginosa* je klasický oportunní patogen, který způsobuje velmi závažné onemocnění u pacientů, kteří mají oslabený organismus, neboli jsou imunodeficientní [1]. *P. aeruginosa* je také řazen mezi nozokomiální patogeny. Infekce způsobené nozokomiálním kmenem mají častěji závažnější průběh [6] .

Jelikož se *P. aeruginosa* běžně vyskytuje ve vodě mohlo by vlhké prostředí představovat velké riziko pro nemocné CF. Přenos infekce se nejčastěji děje prostřednictvím nemocného pacienta s *P.aeruginosa* a dále také špatnou sterilizací pomůcek pro plicní rehabilitaci. U pacientů s CF po proběhlé infekci *P. aeruginosa* dochází ve většině případů ke zhoršení klinického stavu a prognózy pacienta. Infekce bakterií *P. aeruginosa* má často tendenci přecházet do chronicity. Pokud se jedná o primární infekce, bývá tato infekce většinou způsobena nemukózním kmenem bakterie, který je výrazně citlivější na antibiotickou terapii. Chronická forma infekce

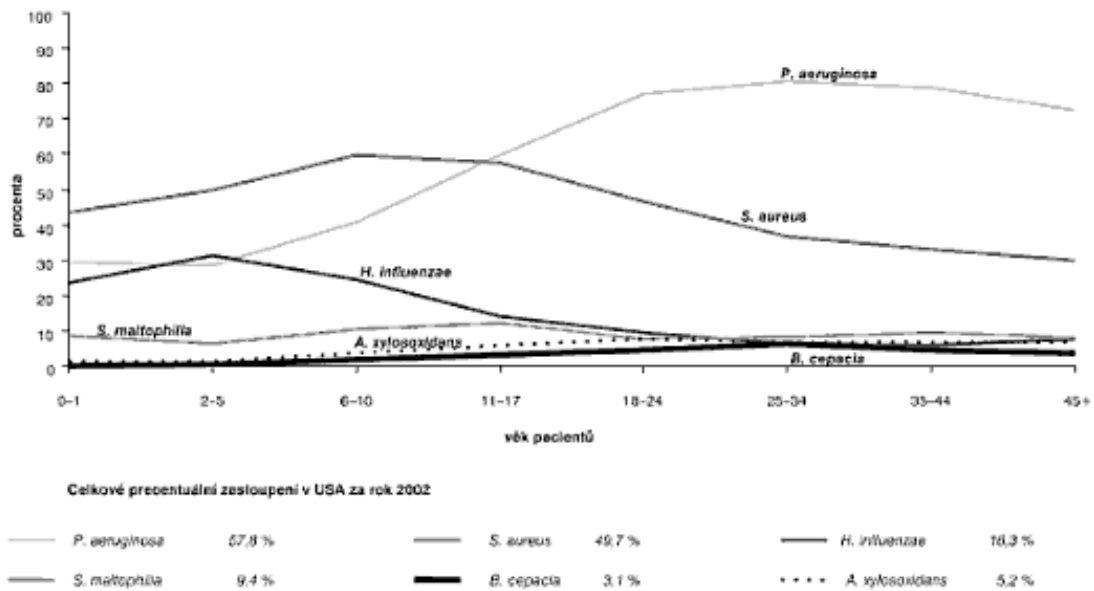
P. aeruginosa je charakterizována opakovanými diagnostikami alespoň po dobu 6 měsíců. Dochází k ní pokud není primární infekce dostatečně včas léčena a je způsobena mukózním kmenem *P. aeruginosa*, které jsou v mnoha případech velmi rezistentní [1].

2.3.3 *Burkholderia cepacia* komplex

Burkholderia cepacia komplex je skupina gramnegativních nefermentujících, aerobních a pohyblivých tyčinek. Dříve byly řazeny k rodu *Pseudomonas*. Patří mezi podmíněné patogeny, které mohou způsobovat onemocnění u pacientů s imunodeficiencí. [6, 8]. Můžeme ji nalézt v inhalátorech, dezinfekcích a také ve stojatých vodách.

Infekce *B. cepacia* komplexem má tendenci přecházet v perzistující formu. Přenos *B.cepacia* komplex je možný i z pacienta na pacienta, ale to jen u některých

kmenů, kde je pak vysoké riziko vzniku epidemie. U ostatních kmenů je přenos z pacienta na pacienta málo pravděpodobný, ke vzniku onemocnění dochází získáním z environmentálního prostředí. Hrozbou u *B. cepacia* komplexu je velká přirozená rezistence k mnoha používaným antibiotikům, která může být prohloubena opětovným podáváním antimikrobních látek, při léčbě jiných kmenů a tím dochází ke vzniku rezistence k většině používaným antibiotikům. *B. cepacia* komplex je původcem chronických infekcí, které se díky vysoké rezistenci nedaří u pacientů s CF léčit. V pokročilém stadiu mohou být příčinou *cepacia* syndromu, což je septikémie způsobena *Burkholderia cepacia* komplexem. Infekce u pacientů s CF má různé klinické projevy, od bezpříznakové chronicity přes postupné poškozování pacientova plicního parenchymu, až po život ohrožující infekci [1].



Obrázek 1. Na obrázku můžeme vidět zastoupení nejběžnějších patogenů u pacientů s CF ve všech věkových kategoriích [1]

3 Rod *Pandoraea*

Rod *Pandoraea* je skupina bakteriálních druhů zahrnující některé nové patogeny. Většina druhů byla popsána během 90. let 20. století. Infekce kmeny *Pandorea* spp. způsobují zhoršení dýchacích funkcí pacientů s CF a mohou se epidemicky šířit mezi pacienty. V mnoha případech se tato infekce projeví až v průběhu chronické infekce *Pseudomonas aeruginosa*. V dnešní době je známo několik druhů z rodu *Pandoraea* a to jsou např.: *P. apista*, která byla prokázána jako nozokomiální patogen a dále sem můžeme řadit *P. pulmonicola*, *P. sputorum*, *P. norinergensis* a *Pandoraea species* [8,9].

3.1 Původ

Rod *Pandoraea* byl pojmenován podle Pandořiny skříňky, která byla původem všech lidských nemocí, příběh pochází z Řecké mytologie. Tento rod je řazen mezi β -proteobakterie, kam patří i rody *Burkholderia* a *Ralstonia*. V mnoha případech bývají zástupci rodu *Pandoraea* chybně diagnostikovány jako zástupci rodu *Burkholderia*, *Ralstonia*, *Alcaligenes*. Chybná diagnostika rodu *Pandoraea* jako rodu *Burkholderia* má za následek zhoršení kvality života pacienta, jelikož pacienti s pozitivní diagnózou *Burkholderia cepacia* komplexu mohou být vyloučeni z transplantační listiny a omezení kontaktů s ostatními pacienty s CF. Chybná diagnóza má dále vliv i na prognózu pacienta s CF. Rod *Pandoraea* je možné izolovat, jak z klinického materiálu, tak i z prostředí [10,11,12].

3.2 Morfologie buněk a mikroskopie

Rod *Pandoraea* je řazen podle Gramova barvení mezi gramnegativní nefermentující tyčinky o velikosti 0,5 – 4 μm . V mnoha případech je popisována jako rovná, nesporulující, aerobní, pohyblivá bakterie. Pohyb bakterie umožňuje v tomto případě jeden polární bičík [11].

3.3 Růstové, kultivační a biochemické vlastnosti

3.3.1 Růstové, kultivační a biochemické vlastnosti rodu *Pandoraea*

Kmeny rodu *Pandoraea* rostou při teplotě 30 – 37°C (u některých druhů byl prokázán růst i při 42°C) za 48 hodin. Tyto gramnegativní tyčinky jsou kataláza pozitivní, neredukují dusitany a netvoří indol. Rod *Pandoraea* roste na BC selektivním agaru, téměř u všech jeho druhů za 48 hodin, kromě druhu *Pandoraea species*, který roste na tomto médiu až po delší inkubaci a to po 96 hodinách. Rod *Pandoraea* neroste na agaru obohaceném 6% chloridem sodným (NaCl) a s přidavkem 10 % laktózy[11].

3.3.2 *Pandoraea apista*

Pandoraea apista je v 64% případech oxidáza pozitivní. Mezi další biochemické vlastnosti toho druhu patří, že produkuje ureázu a nemetabolizuje D ani L -laktózu. Dále metabolizuje maltózu a sacharózu. *P. apista* optimálně roste při teplotě 37 – 42°C za 48 hodin. *P. apista* roste na cetrimidovém agaru (slouží k průkazu *Pseudomonas aeruginosa*) a *Burkholderia cepacia* selektivním agaru. Naopak tento druh neroste na acetamidovém agaru (slouží ke kultivaci nefermentujících bakterií), na agaru s přidavkem 3% a 4,5% chloridu sodného (NaCl) a O/F médiu s přidavkem glukózy (slouží k průkazu bakterií, které zkvašují glukózu a které ji naopak nezksvašují). Dále u druhu *P. apista* neprojevují ani fluoreskující vlastnosti na médiu King's B. *Pandoraea apista* byla také v mnoha případech izolována od pacientů napojených na plicní ventilátor a díky častému záchytu byla potvrzena jako nozokomiální patogen. Prvně byla *P. apista* izolována od pacienta s cystickou fibrózou v Dánsku [9, 11, 12] .

3.3.3 *Pandoraea pulmonicola*

Pandoraea pulmonicola je pojmenována podle její vlastnosti přetrvávat v plicích. Mezi pozitivní testy na biochemické vlastnosti tohoto druhu patří oxidáza, fosfoamidázy, metabolizace D - glukózy a D, L – laktózy. K dalším biochemickým vlastnostem, tentokrát negativním patří ureáza, dále nemetabolizuje maltózu a sacharózu. Ke svému optimálnímu růstu teplotu 37 – 42°C a inkubaci po dobu až

48 hodin. Můžeme ji detekovat na centramidovém agaru (agar pro detekci *Pseudomonas aeruginosa*) a O/F médiu s přidavkem glukózy (slouží průkazu bakterií, které zkvašují glukózu a které ji naopak nezkvašují). Naopak *Pandoraea pulmonicola* nemůžeme detekovat na acetamidovém agaru (slouží ke kultivaci nefermentujících bakterií), agaru s přidavkem 3% a 4,5% chloridu sodného (NaCl), ani tento druh neprokázal fluorescenční vlastnosti na King's B médiu. Prvně byla *Pandoraea pulmonicola* izolována od pacienta s CF pocházejícího z Kanady [11].

3.3.4 *Pandoraea pnomenusa*

Dalším zástupcem rodu *Pandoraea* je *Pandoraea pnomenusa*, kde význam jejího pojmenování je stejný jako u předchozího zástupce – vyskytující se v plicích. Mezi testy na biochemické vlastnosti *Pandoraea pnomenusa* patří pozitivní ureáza a také to, že zkvašuje D, L- laktózu, mezi negativní biochemické vlastnosti patří zkvašování D- glukózy, maltózy, sacharózy a oxidázový test. Optimální teplota, při které můžeme detekovat *Pandoraea pnomenusa* se pohybuje okolo 37 – 42°C za 48 hodin. Tento druh byl pozitivně izolován na agaru obohaceném 3% chloridem sodným, přičemž záchyt na O/F mediu (slouží k průkazu bakterií, které zkvašují glukózu a které ji naopak nezkvašují) s přidavkem glukózy byl negativní. Poprvé byla *Pandoraea pnomenusa* izolována od pacienta s CF z Edinburghu ve Skotsku [11].

3.3.5 *Pandoraea sputorum*

Pandoraea sputorum je dalším zástupcem rodu *Pandoraea* a její název znamená pocházející ze sputa. K jejím pozitivním biochemickým testům patří test na produkci ureázy, zkvašování maltózy; D, L – laktózy a mezi její negativní testy na biochemické vlastnosti řadíme zkvašování sacharózy, oxidázová reakce. Jako u jednoho z mála zástupců nebyl u ní prokázán růst při teplotě 42°C, proto optimální teplota pro růst *P. sputorum* je nejspíše 37°C za 48 hodin. *P. sputorum* můžeme detekovat na *Burkholderia cepacia* selektivním agaru, ze kterého může být chybně identifikována jako jiné rody. Naopak růst nebyl prokázán na acetamidovém agaru (slouží ke kultivaci nefermentujících bakterií) a na O/F mediu s přidavkem glukózy (slouží k průkazu bakterií, které zkvašují glukózu a které ji naopak nezkvašují). Poprvé byla *P. sputorum* izolována od pacienta s CF v USA [11,13].

Vlastnosti	Rod <i>Pandoraea</i> - zástupci			
	<i>P. apista</i>	<i>P. pulmonicola</i>	<i>P. pnomenusa</i>	<i>P. sputorum</i>
Oxidáza	Pozitivní 64%	Pozitivní	Negativní	Negativní
Maltóza	Negativní	Negativní	Negativní	Pozitivní
D - glukóza	x	Pozitivní	Negativní	x
D,L- laktóza	Pozitivní	Pozitivní	Pozitivní	Pozitivní
Sacharóza	Negativní	Negativní	Negativní	x
Ureáza	Pozitivní	Negativní	Pozitivní	Pozitivní
Bičik	Pozitivní	Pozitivní	Pozitivní	Pozitivní

Tabulka 1. Přehled biochemických vlastností [11,13] Legenda : x- data nejsou známá

Kultivační media	Rod <i>Pandoraea</i> - zástupci			
	<i>P. apista</i>	<i>P. pulmonicola</i>	<i>P. pnomenusa</i>	<i>P. sputorum</i>
Acetamidový agar	Negativní	Negativní	16% Negativní	Negativní
Cetrimidový agar	Pozitivní	Pozitivní	66% Negativní	62% Pozitivní
O/F medium s glukózou	Negativní	Pozitivní	Negativní	Negativní
King's B medium	Nefluoreskuje	Nefluoreskuje	Nefluoreskuje	Fluoreskuje
Agar 3% NaCl	82% Negativní	Negativní	Pozitivní	57% Pozitivní
Agar 4,5% NaCl	9% Negativní	Negativní	50% negativní	Negativní
30 - 37°C	Pozitivní	Pozitivní	Pozitivní	Pozitivní
42 °C	Pozitivní	Pozitivní	Pozitivní	Negativní

Tabulka 2. Přehled růstových vlastností na různých mediích [11,13]

3.4 Identifikace fenotypová a genotypová

Identifikace rodu *Pandoraea* je velmi obtížná, díky její podobnosti s jinými gramnegativními rody, jako jsou například *Burholderia cepacia* komplex a *Ralstonia*. Fenotypová identifikace není u tohoto rodu plně specifická. Většina fenotypových vlastností je popsána v kapitole 2.2 a 2.3. Dalšími metodami k identifikaci tohoto rodu jsou používané metody hmotnostní spektrometrie neboli MALDI- TOF MS (viz kapitola 7.2.4.) Rod *Pandoraea* je možné také určit i genotypovými metodami založenými například na srovnání sekvence genu pro 16S rRNA, nebo metodou ARDA (*Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*) identifikace rodu *Pandoraea* je také možná srovnáním sekvence genu *gyrB*.

Tato metoda dokáže dokonale od sebe odlišit druhy rodu *Pandoraea*, než metoda sekvenace genu 16S rDNA, která nás informuje, zda-li je v klinickém materiálu přítomen daný rod, ale už nedokáže tak dokonale odlišit od sebe jednotlivé druhy [11,12, 14].

4 Rod *Inquilinus*

Bakterie z rodu *Inquilinus*, stejně jako *Pandoraea* představují skupinu nových a nově se objevujících bakterií. Tento druh je seskupením potencionálně patogenních kmenů, které sporadicky izolujeme ze sputa pacientů s CF. V roce 2002 byla od pacientů s CF izolována řada neobvyklých gramnegativních kmenů, z nichž některé patřily do rodu *Inquilinus*. Rod *Inquilinus* má pouze jednoho známého zástupce, tím je *I. limosus*. Izolace *I. limosus* je velmi často spojována s výskytem jiných patogenních bakterií jako je např.: *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* komplex a *Staphylococcus aureus*, které způsobují závažné zhoršení klinického stavu, zvláště u pacientů s CF. Infekce *Pseudomonas aeruginosa* má typicky v době izolace *I. limosus* převážně chronický charakter. U mnoha pacientů s pozitivním nálezem *Inquilinus limosus*, byla provedena disková difuzní metoda ke zjištění citlivosti na antibiotika. Mezi antibiotika, která byla rezistentní patří colistin, penicilin, cefalosporiny a monobaktamy, naopak byl velmi citlivý k imipenemu a ciprofloxacinu, kde byly vytvořeny velké zóny inhibice [15,16, 17, 20].

4.1 Původ

Rod *Inquilinus* je řazen do třídy α - proteobakterií, kam dále patří např.: *Azospirillum*, *Rhizobium*. Tento multirezistentní rod, jehož pojmenování znamená „obyvatel místa, které není jeho vlastní“, můžeme izolovat ze sputa pacientů s cystickou fibrózou. *Inquilinus limosus* svým pojmenováním poukazuje s největší pravděpodobností na jeho růstové vlastnosti. *I. limosus* byl poprvé izolován od pacienta s CF v roce 1998 v USA. Byla také zaznamenána jediná izolace tohoto druhu u pacienta, u kterého nebyla předtím diagnostikována CF, ale měl jiné zdravotní obtíže v podobě srdečního onemocnění [15,18].

4.2 Morfologie buněk a mikroskopie

Rod *Inquilinus* je podle Gramova barvení řazen mezi gramnegativní, nesporulující tyčinky. Tyto tyčinky neprodukují pigment a mají schopnost přetrvávat v plicích u pacientů s CF [15,16].

4.3 Růstové, kultivační a biochemické vlastnosti rodu *Inquilinus*

Rod *Inquilinus* patří do skupiny nefermentujících tyčinek, které rostou při 25 – 42°C za 48 hodin. Mezi pozitivní biochemické vlastnosti těchto gramnegativních tyčinek patří katalázový test, produkuje lipázu, fosfatázu a N-acetylglukosoamidázu. K biochemickým testům, které jsou negativní patří metabolizace glukózy, manitolu, inositolu, sorbitolu, sacharózy, arabinózy tvorba indolu a citrátu. Kmeny *Inquilinus* rostou na agaru s přidavkem 1% chloridu sodného (NaCl). Naopak nerostou na agaru s 10% a 6% chloridem sodným (NaCl) a také na *Burkholderia* selektivním agaru [15].

4.3.1 *Inquilinus limosus*

Druh *Inquilinus limosus* roste při 30 – 42°C za 48 hodin na krevním agaru, OFLBL (*oxidation- fermentation- polymyxin - bacitracin- lactose*) a PC médiu (*Pseudomonas cepacia* mediu). Naopak neroste na agaru s přidavkem 6% chloridu sodného (NaCl), *Burkholderia cepacia* agaru, ceftrimidovém agaru (slouží k průkazu *Pseudomonas aeruginosa*) a také neroste na McConkey agaru (agar pro růst gramnegativních bakterií a bakterií fermentující laktózu). *Inquilinus limosus* ve většině případů roste v mukózních koloniích, které jsou příčinou vzniku kolonizace pacienta tímto druhem. Zhoršení klinického stavu nemocného CF (zhoršení plicní ventilace, záněty plic) při infekci tímto druhem, může v mnoha případech vyvolat právě mukózní forma této bakterie. Není to však podmínkou, jelikož u některých pacientů nebyly pozorovány žádné klinické příznaky. Mezi pozitivní testy na biochemické vlastnosti patří oxidáza, kataláza, metabolizuje β – galaktosidázu, N- acetylglukosoamidázu a D – ribózu. K biochemickým testům, které byly negativní, patří produkce ureázy a tvorba indolu [15, 16, 17, 18, 20].

<i>Růst</i>	
<i>Agar/ Médium</i>	<i>I. Limosus</i>
<i>6% NaCl</i>	Negativní
<i>PC médium</i>	Pozitivní
<i>OFLB</i>	Pozitivní
<i>Centrimidový agar</i>	Negativní
<i>BC agar</i>	Negativní
<i>McConkey agar</i>	Negativní
<i>Krevní agar</i>	Pozitivní
<i>Biochemické vlastnosti</i>	
<i>Test</i>	<i>I. Limosus</i>
<i>Ureáza</i>	Negativní
<i>Kataláza</i>	Pozitivní
<i>Oxidáza</i>	Pozitivní
<i>β – galaktosidázu</i>	Pozitivní
<i>N- acetylglukosoamidázu</i>	Pozitivní
<i>D – ribózu</i>	Pozitivní
<i>Tvorba indolu</i>	Negativní

Tabulka 3. Přehled růstových a biochemických vlastností *Inquilinus limosus* [15, 16]

4.4 Identifikace fenotypová a genotypová

Tento nový druh bakterie je těžké identifikovat, hlavně z důvodu jeho nezařazení do databáze většiny diagnostických souprav, pomocí kterých by mohl být diagnostikován. V mnoha případech je fenotypová identifikace také ztížená pomalým růstem tohoto mikroorganismu. Mukózní kmeny tvoří i jiné bakteriální druhy, které se současně vyskytují s *Inquilinus limosus*. Takovým druhem je například *P. aeruginosa*, která roste také v mukózních koloniích. Fenotypové metody k určení tohoto rodu jsou popsány v kapitole 4.2. a 4.3. K dalším metodám, které usnadňují identifikaci této bakterie patří MALDI-TOF MS, což je metoda hmotnostní spektrometrie (viz kapitola 7.2.4.). Rod *Inquilinus* je možné identifikovat pomocí genotypových metod jako jsou např.: 16S rDNA sekvenování a pomocí ARDRA (*Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*) [15, 17,21].

5 Cíl

Cílem mé bakalářské práce bylo zavedení nových selektivních metod kultivace, genotypových identifikačních metod a stanovení kvalitativní a kvantitativní citlivosti k antibiotikům sbírkových a klinických izolátů *Pandoraea* a *Inquilinus* od pacientů s CF.

6 Materiál

6.1 Bakteriální kmeny

6.1.1 Rod *Pandoraea*

Referenční kmeny ze Sbírký BCCM/LMG *Bacteria Collection*, *Universiteit Gent - Laboratorium voor Mikrobiologie, Gent, Belgium*

- *Pandoraea apista* LMG 16407
- *Pandoraea pulmonicola* LMG 18106
- *Pandoraea pnomenusa* LMG 18087
- *Pandoraea sputorum* LMG 18819

Klinické izoláty pocházely ze Sbírký Ústavu lékařské mikrobiologie, 2.LF UK a FN Motol. Tyto izoláty byly získány ze sputa pacientů s CF dispenzarizovaných v motolském Centru pro cystickou fibrózu (CCF). Identifikované byly pomocí analýzy MALDI-TOF MS (princip viz kapitola 7.2.4.1.).

<i>Klinické izoláty</i>					
Číslo izolátu	Druh bakterie	Pacient	Datum izolace	Diagnóza	Oddělení
461	<i>P. pnomenusa</i>	Pacient 1	2.5.2011	E840	CCF
470	<i>P. apista</i>	Pacient 2	16.5.2011	E840	PEJ5
527	<i>P. pnomenusa</i>	Pacient 3	3.10.2011	E840	PNA
533	<i>P. pnomenusa</i>	Pacient 3	18.10.2011	E840	PNA
543	<i>P. apista</i>	Pacient 2	7.12.2011	E840	CCF

Tabulka 4. Přehled klinických izolátů u pacientů s diagnózou CF, *Legenda:* E840 – cystická fibróza s plicními projevy, CCF – Centrum cystické fibrózy, PNA – Plicní ambulance, PEJ5 – Pediatrie JIP

6.1.2 *Inquilinus limosus*

Referenční kmen pochází ze Sbírký BCCM/LMG *Bacteria Collection*, *Universiteit Gent - Laboratorium voor Mikrobiologie, Gent, Belgium*

- *Inquilinus limosus* LMG 20952

Klinický izolát pocházel ze Sbírký Ústavu lékařské mikrobiologie, 2. LF UK a FN Motol. Tento izolát byl kultivovaný ze sputa pacienta s CF dispenzarizovaného v motolském Centru pro cystickou fibrózu (CCF). Kmen byl identifikovaný pomocí analýzy MALDI-TOF MS (princip viz kapitola 7.2.4.1.)

- *Inquilinus limosus* 550

6.1.3 *Burkholderia cepacia*

Referenční kmen pochází ze Sbírký BCCM/LMG *Bacteria Collection*, *Universiteit Gent - Laboratorium voor Mikrobiologie, Gent, Belgium*

- *Burkholderia cepacia* LMG18829

6.2 Kultivační media

<u>Typ půdy</u>	<u>zkratka</u>	<u>Výrobce</u>
<i>Mueller – Hintonův agar</i>	MH	OXOID
<i>Krevní agar - Columbia</i>	COL	OXOID
<i>Endova půda</i>	ENDO	OXOID
<i>Sabouraudův agar</i>	SAB + GEN	OXOID
<i>Burkholderia cepacia agar CM0995</i>	BC CM0995	OXOID

Tabulka 5. Přehled použitých kultivačních medií

6.3 Antibiotika

6.3.1 Antibiotika používaná na diskový difúzní test

Používaná antibiotika byla ve formě napuštěných disků z filtračního papíru s předepsanou koncentrací.

<i>Název antibiotika</i>	<i>Zkratky</i>	<i>Obsah ATB v disku</i>	<i>Výrobce</i>
Colistin	CT 10	10 µg	OXOID
Gentamicin	CN 10	10 µg	OXOID
Netilmicin	NET 30	30 µg	OXOID
Tobramycin	TOB 10	10 µg	OXOID
Ampicilin/ Sulberazon	SAM 20	20 µg	OXOID
Cotrimoxazol	SXT 25	25 µg	OXOID
Ofloxacin	OFC 5	5 µg	OXOID
Ciprofloxacin	CIP 5	5 µg	OXOID
Amykacin	AK 30	30 µg	OXOID
Ceftazidim	CAZ 30	30 µg	OXOID
Piperacilin/ Tazobactan	TZP 110	110 µg	OXOID
Cefepim	FEP 29	29 µg	OXOID
Cefoperazon/Sulbactan	SCF 105	105 µg	OXOID
Imipenem	IMP 10	10 µg	OXOID
Meropenem	MEM 10	10 µg	OXOID
Tigecyklin	TGC 15	15 µg	OXOID

Tabulka 6. Přehled antibiotických disků a jejich koncentrací

6.3.2 Antibiotika obsažená v mikrotitrační destičce pro stanovení minimální inhibiční koncentrace

Minimální inhibiční koncentrace (MIC) pro jednotlivá antibiotika byla stanovena pomocí mikrodiluční metody v Mueller-Hintonově agaru (princip viz kapitola 7.4.2.). Rozmezí koncentrace antibiotik v jamkách destičky je různé pro jednotlivá antibiotika.

<u>Název antibiotika</u>	<u>Obsah ATB</u>	<u>Výrobce</u>
Ampicilin	0,5 - 64 µg	TRIOS
Ampicilin/ Sulberazon	0,25 - 32 µg	TRIOS
Cefazolin	1 - 128 µg	TRIOS
Cefuroxim	0,5 - 64 µg	TRIOS
Cefotaxim	0,5 - 64 µg	TRIOS
Gentamicin	0,25 - 32 µg	TRIOS
Cotrimoxazol	1 - 128 µg	TRIOS
Colistin	0,25 - 32 µg	TRIOS
Kyselina oxolinová	0,5 - 64 µg	TRIOS
Ofloxacin	0,125 - 16 µg	TRIOS
Tetracyklin	0,25 - 32 µg	TRIOS
Aztreoam	0,25 - 16 µg	TRIOS
Piperacilin	1 - 128 µg	TRIOS
Piperacilin/ Tazobactant	0,5 - 64 µg	TRIOS
Cefoperazom	0,5 - 64 µg	TRIOS
Cefotaxim	0,125 - 16 µg	TRIOS
Ceftazidim	0,25 - 32 µg	TRIOS
Cefepim	0,063 - 8 µg	TRIOS
Cefoperazom/Sulberazon	0,25 - 32 µg	TRIOS
Meropenem	0,25 - 32 µg	TRIOS
Ciprofloxacin	0,063 - 8 µg	TRIOS
Tigecyklin	0,063 - 8 µg	TRIOS
Tobramycin	0,25 - 32 µg	TRIOS
Amikacin	0,5 - 32 µg	TRIOS

Tabulka 7. Přehled antibiotik jejich koncentrací přítomných v mikrotitrační destičce u metody MIC

6.4 Komerční sady

Některé testy jsme prováděli pomocí komerčně dodávaných sad od různých výrobců (viz tabulka)

<u>Komerční sada</u>	<u>Užití</u>	<u>Výrobce</u>
DNA marker	DNA standart pro elektroforézu	TOP BIO, ČR
PCR master mix	PCR	TOP BIO, ČR
Oxidáza	průkaz oxidázy	ITEST plus s.r.o. , ČR
Amplicor RSP kit	izolace DNA	Roche , DE

Tabulka 8. Přehled komerčních sad

6.5 Roztoky

6.5.1 Roztoky a chemikálie pro provedení elektroforézy

<u>Roztoky a chemikálie</u>	<u>Výrobce</u>
50% TBE pufr (Tris kyselinu boritou)	Lékarna FN Motol
Ethidium bromid	SIGMA
Agaróza	SERVA

Tabulka 9. Přehled použitých roztoků a chemikálií

- Složení TBE pufru

Tris	45 mM
kyselina boritá	45 mM
EDTA (kyselina tetradiamin octová)	1 mM

Tabulka 10. Složení TBE pufru používaného při elektroforéze

Kyselina boritá, Tris a kyselina tetradiamin octová musí být rozpuštěny v destilované vodě, aby TBE pufr mohl být použit k přípravě gelu na elektroforézu.

Příprava 1% agarózového gelu na elektroforézu

- agaróza 0,30 g
- TBE pufr 30 ml
- Ethidium bromid 1,5 μ l

6.5.2 Roztoky a chemikálie pro Gramovo barvení

<u>Roztoky a chemikálie</u>	<u>Koncentrace</u>	<u>Výrobce</u>
Krystalová violet'	1:4	TEST – LINE, ČR
Lugolův roztok	Koncentrovaný	TEST – LINE, ČR
Aceton	Koncentrovaný	PENTA, ČR
Karbofuchsin	1:10	TEST – LINE, ČR

Tabulka 11. Přehled použitých roztoků a chemikálií k provedení Gramova barvení

- Příprava Lugolova roztoku pro Gramovo barvení

jód	1,0 g
jodid draselný	2,0 g
voda	300 ml

Tabulka 12. Složení Lugolova roztoku

Jód i jodid draselný se rozetře v třecí misce a následně se smíchá s vodou, kde se rozpustí [23].

6.5.3 Chemikálie pro provedení katalázového testu

Chemikálie	Test	Výrobce
Peroxid vodíku H ₂ O ₂	kataláza	COOPHARMA s.r.o., ČR

Tabulka 13. Chemikálie k provedení katalázového testu

6.6 Primery pro rod *Pandoraea* a *Inquilingus*

Primer	Sekvence	Teplota tání
<i>Rod Pandoraea</i>		
PanF - <i>Rod Pandoraea</i>	5' - gggctyaacctgggaactgcattc - 3'	68°C
PanR - <i>Rod Pandoraea</i>	5' - cgryttggrccctctgtaccg - 3'	69,5°C
AppuF - <i>P. apista</i>, <i>P. pulmonicola</i>	5' - cagtggggaattttggacaatgggcgca - 3'	70,6°C
PanR - <i>Rod Pandoraea</i>	5' - cgryttggrccctctgtaccg - 3'	72°C
Pan 326 - <i>Pandoraea apista</i>	5' - gtggggaattttggacaatg - 3'	52°C
Pan 530 - <i>Pandoraea apista</i>	5' - attccgattaacgcttgac - 3'	54°C
<i>Rod Inquilingus</i>		
<i>il1d - Inquilingus limosus</i>	5' - taatacgaagggggcaagcgt - 3'	58,8°C
<i>il1r - Inquilingus limosus</i>	5' - caccctctcttgattcaagc - 3'	55,6°C

Tabulka 14. Použité primery pro rod *Pandoraea* a *Inquilingus*

6.6.1 Výběr primerů pro genotypovou identifikaci

Primery pro rod *Pandoraea* byly vybrány na základě publikovaných informací (Indetification Of *Pandoraea* Species by 16S Ribosomal DNA- Based PCR Assays, Tom Coenye at all. , Journal of Clinical Mikrobiology, Dec. 2001, Vol. 39, No.12) Primery pro průkaz *Pandora apista* 326-530 byly navrženy na základě sekvence strukturálního genu pro 16S rRNA pomocí specializovaného softwaru ze serveru *National Center for Biotechnology Information* na adrese <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/AF139173.1> a specializovaného softwaru na adrese http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www_results.cgi.

Primery pro rod *Inquilinus* byly vybrány na základě publikovaných informací (*Inquilinus limosus* and Cystic Fibrosis, Fadi Bittar at all, Emerging Infectious Diseases, June 2008, Vol. 14, No.6).

7 Metody

7.1 Odběr sputa

Odběr ranního sputa se provádí do sterilní odběrové nádoby, nejčastěji se jedná o širokou, plastovou zkumavku. Odběr sputa je často zatížen chybou při jeho odběru. Někteří pacienti neumí správně tento odběr provést, proto by měl být prováděn pod dohledem zdravotnického personálu, nejlépe lékaře, ten by se měl přesvědčit, zda je odebráno skutečně sputum nebo jen sliny a to tak, že ve sputu by měly být přítomny vločky hnisu, které ve slinách nejsou přítomny. Sputum k vyšetření by mělo být do laboratoře dopraveno do 2- 3 hodin po odběru [22].

7.2 Fenotypová identifikace

Fenotypová identifikace je u rodu *Pandoraea* a *Inquilinus* velmi složitá, a to v důsledku jejich velké podobnosti s jinými bakteriálními rody, zejména ze skupiny gramnegativních nefermentujících tyčinek. Mezi fenotypovou identifikaci řadíme kultivaci, Gramovo barvení, selektivní průkaz bakterií a hmotnostní spektrometrickou analýzu MALDI –TOF MS.

7.2.1 Kultivace

Kultivace rodu *Pandoraea* a *Inquilinus* je poměrně zdlouhavá. Kultivace těchto rodů byla prováděna u referenčních kmenů a klinických izolátů. Kmeny byly uchovávány v mediu obsahující živný bujón a 50% glycerolu při -80°C. Díky vysokému obsahu glycerolu nedochází ani při nízkých teplotách ke tvorbě krystalů a destrukci bakteriálních buněk. Následně byly zamražené kmeny vyočkovány sterilní kličkou na obohacené agary, jako jsou krevní agar, Endova půda, Sabouraudův agar, dále také na živný agar, jako je Mueller - Hintonův agar a také na selektivní půdy, mezi které patří BC agar. Růst byl pozorován při různých teplotách (22°C, 30°C, 37°C, a 42°C) a to po dobu 24 a 48 hodin. Dále byla kultivována i *Burkholderia cepacia* na MH agaru při 37°C po dobu 24 hod, která byla následně použita k selektivnímu průkazu rodu *Pandoraea*.

7.2.2 Gramovo barvení

Patří mezi diagnostická barvení. Poskytuje informace o přítomnosti, tvaru, počtu, velikosti, uspořádání bakterií, ale také nás informuje, zda se jedná o grampozitivní či gramnegativní bakterie [22, 23].

7.2.2.1 Příprava preparátu

Na vyžíhané podložní sklíčko kápneme kapku fyziologického roztoku, ve kterém z narostlé kultury kličkou vytvoříme suspenzi. Preparát necháme zaschnout a poté fixujeme nad plamenem.

7.2.2.2 Vlastní barvení

Vlastní barvení preparátu provádíme podle následujícího postupu s promytím vodou po každém barvení

- Krystalová violet 20s – 30 s
- Lugolův roztok 20s – 30s
- Aceton
- Karbolfuchsin 30s – 60s

7.2.2.3 Výsledek barvení a vlastní mikroskopování preparátu

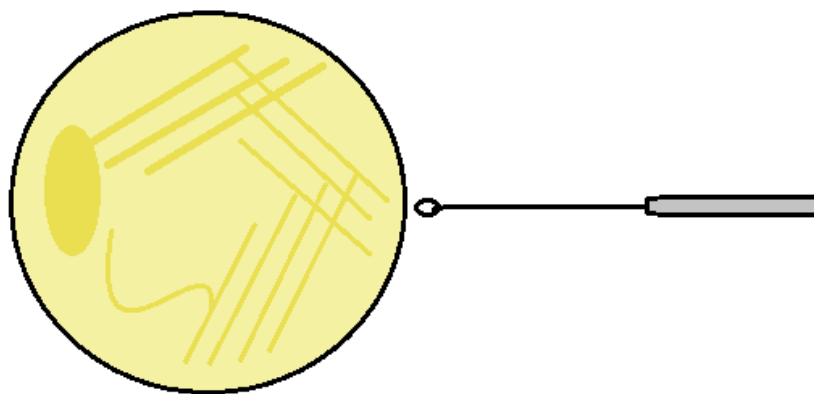
Na preparát po zaschnutí kápneme kapku imerzního oleje a pozorujeme imerzním objektivem při celkovém zvětšení 1500x. V mikroskopu můžeme pozorovat gramnegativní bakterie, které jsou zbarveny červeně, a grampozitivní bakterie, které jsou zbarveny modrofialově. Rozdílná barvitelnost je zapříčiněna odlišnou stavbou buněčné stěny grampozitivních a gramnegativních bakterií. U grampozitivních bakterií je jejich pozitivita zapříčiněna silnější vrstvou peptidoglykanu, která zabrání po oplachu acetonem odstranění komplexu krystal violeti s jodem. Zatímco u gramnegativních bakterií je slabší vrstva peptidoglykanu a je zde přítomno více lipidových složek, které působením acetonu tvoří kanály pro lepší průchod komplexu krystalové violeti a jódu z bakteriální buňky a jejich následné dobarvení karbolfuchsinem, který způsobí jejich červené zbarvení [22, 23].

7.2.3 Selektivní průkaz rodu *Pandoraea*

Selektivní průkaz byl prováděn z důvodu podobnosti rodu *Pandoraea* s jinými druhy bakterií a jejich časté chybné identifikace. V experimentální části zaměřené na selektivní průkaz byla použita *Burkholderia cepacia*, jejíž některé fenotypové vlastnosti jsou shodné s rodem *Pandoraea*.

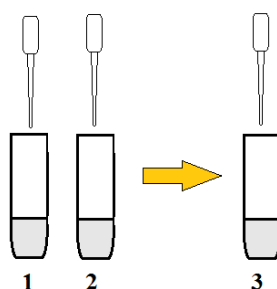
7.2.3.1 Selektivní průkaz rodu *Pandoraea* s použitím rodu *Burkholderia cepacia*

Po předešlé kultivaci referenčních kmenů *Pandoraea apista* (LMG 16407), *P. pulomonicola* (LMG 18106), *P. pnomenusa* (LMG 18087) a *P. sputorum* (LMG 18819) ze zamražených vzorků (-80°C) na MH agaru po dobu 48 hod, byla připravena suspenze ve fyziologickém roztoku o intenzitě zákalu 0,5MF ($1,5 \cdot 10^8$ CFU/ml).



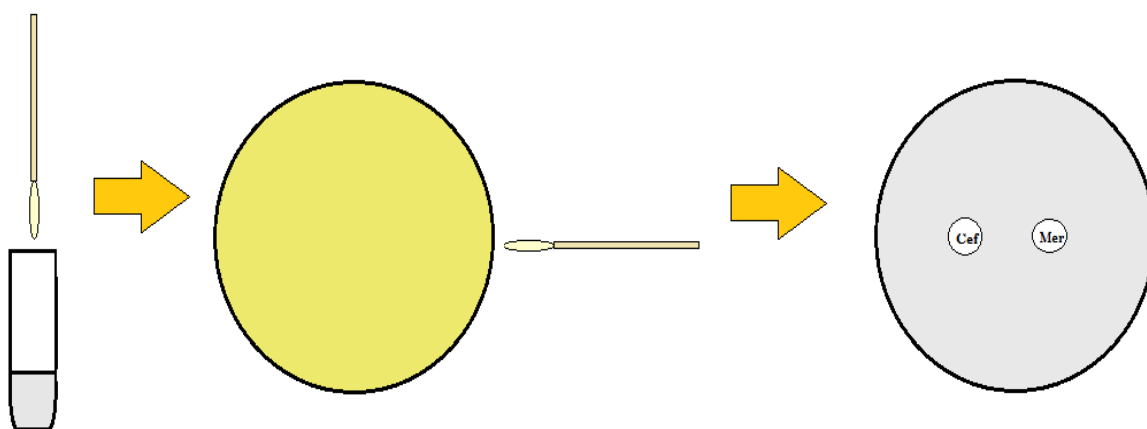
Obrázek 2. Kultivační plotna s narostlou kulturou

Následně stejným způsobem jsme pokračovali i s referenčním kmenem *Burkholderia cepacia* (LMG 20952). Zákaly byly připraveny podle 0,5MF ($1,5 \cdot 10^8$ CFU/ml). Z obou připravených suspenzí bylo odebráno 0,5 ml, které byly smíchány v čisté sterilní zkumavce.



Obrázek 3. Příprava směsi *P. apista* a *B. cepacia* (3) ze suspenzí narostlých kultur *P. apista*(1) a *B. cepacia*(2)

Po smísení obou suspenzí byla připravená směs masivně inokulována na MH agar a BC agar. Na MH agar a BC agar po inokulaci bylo podle výsledků difúzního diskového testu citlivosti na antibiotika, vybrána dvě antibiotika, která byla rezistentní u rodu *Pandoraea* a naopak citlivé u rodu *Burkholderia*. V našem případě byly použity antibiotické disky meropenem a ceftazidim. Rozočkované plotny s antibiotickými disky byly kultivovány při 37°C po dobu 48 hodin. Po kultivaci byla z okolí disku meropenem a ceftazidim provedena izolace na MH agaru, kultivace probíhala 48 hodin při 37°C. Následně narostlé kultury z okolí disků byly analyzovány pomocí MALDI- TOF MS.



Obrázek 4. Masivní inokulace směsi kmenů *Pandoraea apista* a *Burkholderia cepacia* a vložení antibiotických disků – meropenem a ceftazidim

7.2.3.2 Selektivní průkaz rodu *Pandoraea* z klinického materiálu

Kmeny *Pandoraea* byly nejprve kultivovány ze zamražených vzorků (při -80°C) na MH agaru při teplotě 37°C po dobu 48 hodin. Po proběhlé kultivaci byla připravena, opět jako v předchozím případě suspenze o intenzitě zákalu 0,5 MF ($1,5 \cdot 10^8$ CFU/ml), připravená podle standardů v rozmezí 0,5 MF ($1,5 \cdot 10^8$ CFU/ml).

Do čisté sterilní zkumavky bylo odpipetováno 0,5ml klinického materiálu (sputum), do kterého bylo přidáno 0,5ml suspenze vytvořené z nakultivovaného kmene *Pandoraea*.

Směs byla masivně inokulována na MH agar a také na BC agar, poté byly na takto inokulované plotny vloženy dva antibiotické disky, které byly vybrány podle citlivosti na antibiotika, provedených u rodu *Pandoraea*. V našem případě byly použity antibiotické disky obsahující meropenem a ceftazidim.

Následně byly plotny vloženy do termostatu při teplotě 37°C na 48 hodin. Z narostlých kultur byla provedena izolace z okolí antibiotických disků na MH agar. Po 48 hodinách kultivace při 37°C byly narostlé kultury podstoupeny analýze MALDI-TOF MS.

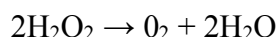
7.2.4 Biochemické vlastnosti a identifikace

7.2.4.1 Průkaz oxidázy - oxidázový test

V oxidázovém testu jde o průkaz enzymů zapojených do dýchacího řetězce bakterií. Měl by tedy být pozitivní u striktně aerobních bakterií. Oxidázový test je prováděn pomocí diagnostického proužku, který je napuštěný určitým reagens. Tento papírek se buď přikládá přímo na narostlou kolonii, nebo se kolonie může aplikovat na fyziologickým roztokem navlhčený papírek. V přítomnosti cytochromoxidázy vzniká v přítomnosti ethyloxethyl-parafenylendiaminu a alfa-naftolu indofenolová modř. Do dvou minut po aplikaci narostlé kultury by mělo tedy v případě positivity dojít ke zmodrání diagnostického proužku [23, 29].

7.2.4.2 Průkaz katalázy - katalázový test

Enzym kataláza je charakteristický pro aerobní i fakultativně anaerobní bakterie. Kataláza je enzym, schopný odbourávat peroxid vodíku, který je pro aerobní a fakultativně anaerobní bakterie jedovatý. Při katalázovém testu dochází k rozkladu peroxidu vodíku na kyslík a vodu [29].



Provedení tohoto testu je velmi jednoduché. Do sterilní zkumavky, nakapeme několik kapek 3% peroxidu vodíku a do tohoto roztoku aplikujeme pomocí sterilní kličky čistou kulturu. V případě positivity dochází k uvolňování kyslíku a tím ke vzniku bublinek.

7.2.5 MALDI- TOF MS (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry*)

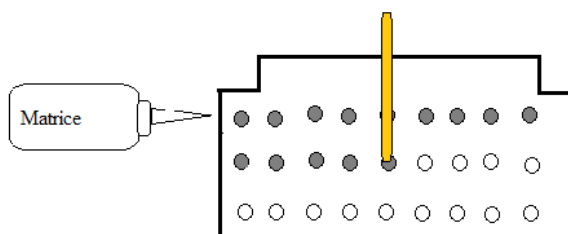
Fenotypová metoda MALDI – TOF MS patří mezi fyzikální metody, kam také řadíme spektrometrické metody. Zkratka MALDI – TOF MS je z anglického názvu *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry*.

Principem hmotnostní spektrometrie je rozdělení nabitých částic v el. poli podle jejich molekulových hmotností [21, 24].

7.2.5.1 Princip MALDI- TOF MS

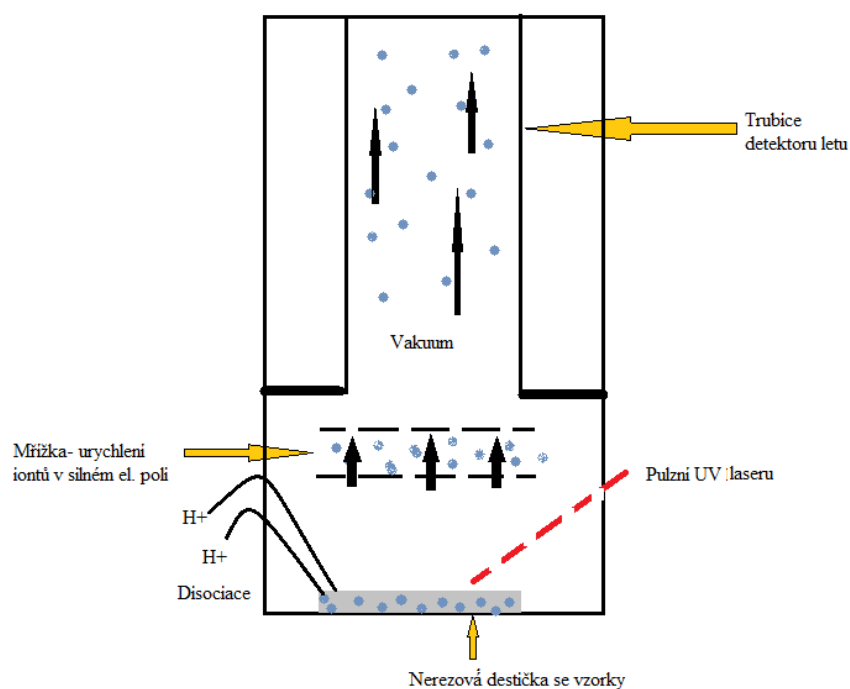
Tato metoda je založena na stanovení hmotnosti atomů a molekul v ionizovaném stavu, využívající rozdílné chování těchto částic v magnetickém anebo také elektrickém poli. MALDI – TOF MS je metoda, která využívá principu ionizace zkoumaný měřicím dobu letu těchto částic urychlených elektrickým polem. K tomu, aby docházelo ke štěpení částic správným způsobem, musí být použita matrice. Matrice je látka, která zajišťuje přenos ionizační energie, kterou vytváří laser, na částice vzorku. Matrice zde slouží jako ochrana před nežádoucím štěpením molekul.

Díky této látce, která se aplikuje na nanášený vzorek je možno stanovovat více částic respektive jejich molekulové hmotnosti. K tomu, aby mohly být stanoveny látky s vyšší molekulovou hmotností je používán přístroj MALDI – TOF MS. Vzorek a matrice je aplikována na nerezovou destičku, která je zasažena pulzním UV laserem.



Obrázek 5 : Aplikace bakteriální kultury na nerezovou destičku

Tento proud laseru je absorbován matricí, kde dochází k rozkladu této složky s následující ionizací molekul vzorku. Ve vzorku dochází k adici kationtu či aniontu s následným vznikem radikálu v důsledku ztráty elektronu, anebo také může dojít k mířenému rozbití na částice a jejich opětovnému složení. Stanovované částice jsou urychleny silným elektrickým polem a poté vstupují přes mřížku do vakua, které je přítomno v trubici s detektorem doby letu částic. V této trubici se částice pohybují rychlostí, odpovídající velikosti jejich hmotnosti a náboje, z nichž se pak vypočte poměr molekulové hmotnosti a náboje částic [24, 25].



Obrázek 6 : Princip přístroje MADI-TOF MS

7.3 Genotypová identifikace

Součástí genotypové identifikace je izolace bakteriální DNA, polymerázová řetězová reakce (PCR) a elektroforéza v agarózovém gelu.

7.3.1 Izolace bakteriální DNA

Izolaci DNA z narostlé bakteriální kultury byla provedena pomocí komerčně dodávané sady *AMPLICOR Respiratory Specimen Preparation Kit*. Biomasa z čerstvě narostlé kultury byla resuspendována kličkou v 200 μ l destilované vody. Do čisté mikrozkušavky bylo odpipetováno 500 μ l *Respiratory Specimen Wash Solution (RW)* a k němu přidáno 100 μ l důkladně zvortexované suspenze bakteriální kultury. Tuto směs po smíchání je nutné po dobu 5s opět zvortexovat a následně vložit do centrifugy na 10 minut při 13 000 otáčkách (10 min/13 000 otáčkách). Po centrifugaci slijeme vzniklý supernatant, přičemž by izolovaná DNA měla zůstat na stěnách mikrozkušavky. Po odlití necháme mikrozkušavky po dobu 30 s dnem vzhůru, aby

došlo k odstranění zbytku roztoku. Po celou dobu odstraňování supernatantu, musíme se zkumavkou manipulovat velmi opatrně.

Následně bylo do mikrozkušavky přidáno 100 μ l *Respiratory Specimen Lysis Reagent* (RL). Směs musí být vortexována po dobu 5s a poté temperována při 60°C po dobu 45 minut v termobloku. Po ukončení temperace je nutné zcentrifugovat zahřátou směs jednorázově asi 5s. Jako poslední roztok k extrakci DNA je přidáno do směsi po centrifugaci 100 μ l *Respiratory Specimen Neutralization Reagent* (RN) do směsi po centrifugaci. Následuje zvortexování směsi, která obsahuje DNA, 100 μ l RL a 100 μ l RN). Po všech těchto krocích je DNA izolována a může být použita při amplifikaci nebo může být zamrazena při -20°C pro pozdější amplifikaci. Celá izolace DNA by měla být prováděna v laminárním boxu, aby došlo k zabránění možné kontaminace cizorodou DNA.

7.3.2 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Mezi jednu z nejběžněji používaných molekulárně-biologických metod patří polymerázová řetězová reakce, která má široké spektrum využitelnosti.

7.3.2.1 Princip polymerázové řetězové reakce (PCR)

Principem PCR je amplifikace neboli zmnožení určitého úseku pomocí PCR, zjednodušeně řečeno se jedná o několikanásobnou replikaci DNA. Základními kroky PCR jsou denaturace, annealing (přisednutí) primerů a elongace (syntéza) nukleotidových řetězců. V PCR reakci se využívá aktivita enzymu *Taq*-polymerázy. K prvním krokům PCR patří denaturace dvouvláknového řetězce DNA, jelikož PCR probíhá pouze na jednom vlákně DNA. Tento krok probíhá při teplotě 94°C. Druhým krokem je nasednutí primerů (annealing), které probíhá při teplotě závislé na délce a nukleotidovém složení použitých primerů. Při tomto kroku dochází k navázání primerů na komplementární úseky, templátového vlákna DNA. Primery ohraničují úsek, který potřebujeme amplifikovat. Ve třetím kroku, *Taq*-polymeráza podle komplementarity dosyntetizovává nové vlákno DNA k vlákně templátovému. Tento krok probíhá při 72°C. Před začátkem identifikace patogenů v klinickém materiálu je nutné provést optimalizaci PCR a to pomocí stanovení optimální nasedací teploty primerů [26, 27].

7.3.2.2 Postup provedení polymerázové řetězové reakce (PCR)

K provedení polymerázové řetězové reakce byly použity tyto reagenty, a to v následujícím pořadí:

<i>Pacienti - vzorky</i>	
<i>Reagencie</i>	<i>Množství μl</i>
Destilovaná voda	9,5
Master mix	12,5
Primer 1 (reverse)	0,75
Primer 2 (forward)	0,75
DNA	1,5
<i>Negativní kontrola</i>	
<i>Reagencie</i>	<i>Množství μl</i>
Destilovaná voda	9,5
Master mix	12,5
Primer 1 (reverse)	0,75
Primer 2 (forward)	0,75

Tabulka 15. Reagenty potřebné pro provedení PCR

7.3.3 Elektroforéza

7.3.3.1. Princip elektroforézy

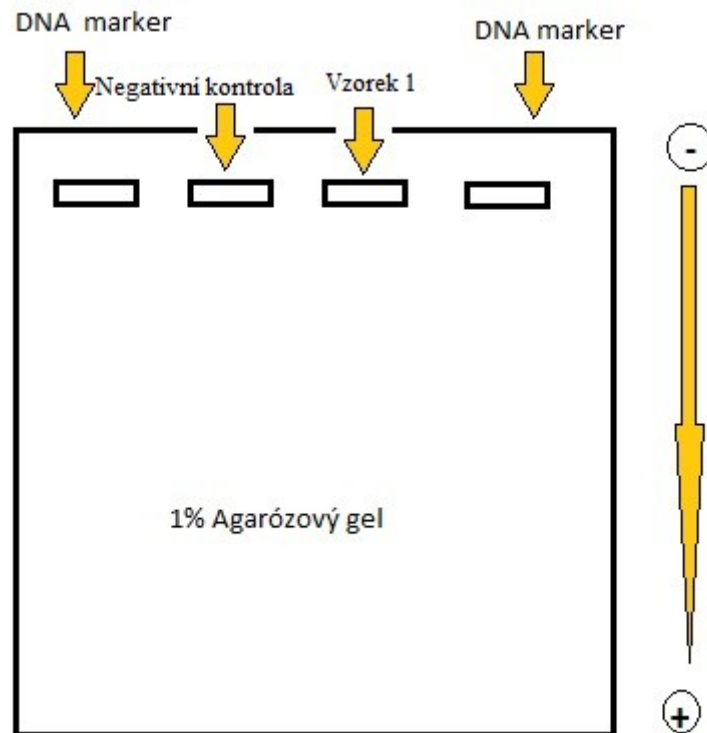
Elektroforéza je metoda, která slouží k rozdělení látek nesoucích elektrický náboj. Rozdělení těchto látek závisí na jejich pohyblivosti v elektrickém poli, kde působí stejnosměrný elektrický proud, dále je závislá na velikosti elektrického náboje dané látky a pH prostředí, ve kterém elektroforéza probíhá.

7.3.3.2. Provedení elektroforézy

Pro elektroforézu byl nejdříve připraven 1% agarózový gel, navážením 0,3 g agarózy na analytických vahách, která byla následně působením zvýšené teploty rozpuštěna v 30 ml TBE pufru.

Do roztoku gelu byl přidán 1 μ l ethidium bromidu a horký gel byl přelit do formy na tvorbu gelu. Ještě do horkého gelu, byl vložen hřeben, který vytvořil zářezy pro nanášení vzorků. Agarózový gel byl ponechán ztuhnout si 45 minut.

Po uplynulé době tuhnutí byl vyjmut hřeben na tvorbu zářezů a gel přenesen do elektroforetické vany s pufrem. Následně byl do gelu aplikován DNA marker, amplifikované vzorky z PCR a negativní kontrolu. Elektroforéza probíhala při 100V po dobu přibližně 20 minut. Po skončení elektroforézy byl gel se vzorky vložen pod UV světlo a výsledky vyhodnoceny vizuálně a pořízena fotodokumentace.



Obrázek 7: Schéma nanášení DNA markeru, vzorků z PCR a negativní kontroly do 1% agarózového gelu

7.4 Stanovení citlivosti k antibiotikům

K tomu, aby mohla být správně určena léčebná terapie, musí být provedeno stanovení citlivosti k antibiotikům. Stanovení citlivosti k antibiotikům provádíme dvěma metodami, a to difúzním diskovým testem a stanovením minimální inhibiční koncentrace antibiotik [23].

7.4.1 Stanovení citlivosti k antibiotikům difúzním diskovým testem

Tato metoda se používá k rutinnímu stanovení citlivosti k antibiotikům a je řazena ke kvantitativním testům. K jejímu provedení není potřeba speciální přístrojové vybavení, ale pouze běžné laboratorní pomůcky.

7.4.1.1 Princip metody

K provedení tohoto testu se používají papírové disky, které jsou napuštěny doporučenou koncentrací antibiotika. Na kultivační médium se aplikují tyto papírové disky, které následně absorbují vodu z média. Během toho antimikrobní látky difundují do agarů. V okolí disku se tvoří různě velké inhibiční zóny v závislosti na inhibici testovaného bakteriálního kmene antimikrobiálními látkami. Po proběhlé inkubaci se následně odečítají vzniklé zóny inhibice a podle referenčního rozmezí pro každou antimikrobiální látku se určí, zda je mikrob citlivý nebo rezistentní [23,28].

7.4.1.2 Postup při provedení difúzního diskového testu ke stanovení citlivosti na antibiotika

Z narostlé kultury je potřeba připravit suspenzi, jejíž zákal ve fyziologickém roztoku, bude odpovídat 0,5 MF ($150 \cdot 10^6$ CFU/ml, k vytvoření tohoto zákalu postačí většinou jedna středně velká kolonie). Následně s vytvořeným zákalem přelijeme kultivační médium a přebytečné médium slijeme, v našem případě byl jako kultivační médium použit Mueller – Hintonův agar. Na takto inokulovanou plotnu aplikujeme pomocí suspenzoru antibiotické disky s doporučenou koncentrací antimikrobiální látky, a to nejpozději do 15 minut po naočkování. Při provádění tohoto testu byly použity antibiotické disky pro skupinu nefermentujících bakterií. Plotny se v našem případě inkubovaly při 37°C po dobu 24 – 48 hodin, po nichž byly odečítány. Delší doba inkubace (48 hodin) byla provedená v důsledku pomalého růstu mikrobiální kultury [23].

<u>Antibiotika</u>	<u>Zkratky</u>	<u>Referenční zóny inhibice (mm)</u>
Colistin	CT 10	10
Gentamicin	CN 10	15
Netilmicin	NET 30	15
Tobramycin	TOB 10	15
Ampicilin/ Sulberazom	SAM 20	15
Cotrimoxazol	SXT 25	16
Ofloxacin	OFC 5	16
Ciprofloxacin	CIP 5	21
Amykacin	AK 30	17
Ceftazidim	CAZ 30	18
Piperacilin/ Tazobactam	TZP 110	21
Cefepim	FEP 29	18
Cefoperazon/Sulbactam	SCF 105	21
Imipenem	IMP 10	16
Meropenem	MEM 10	16
Tigecyklin	TGC 15	19

Tabulka č. 16 – Antibiotické disky použité pro provedení difúzního diskového testu, jejich zkratky a referenční rozmezí v milimetrech pro citlivé kmeny

7.4.2 Stanovení minimální inhibiční koncentrace antibiotik (MIC)

MIC patří mezi kvantitativní testy stanovení citlivosti k antimikrobním látkám. Jedná se o diluční metodu, která je prováděna v mikrotitračních destičkách. Tyto destičky ve svých jamkách obsahují různé koncentrace antimikrobních látek, rozpuštěných v Mueller- Hintonově agaru [23].

Do jamek mikrotitrační destičky, které obsahují rozdílné koncentrace antibiotik je inokulováno standardní množství stanovovaného mikroorganismu. Po určené době inkubace (24 -48 hod podle typu mikroba), která probíhá při 37°C se odečítá nejnižší koncentrace antimikrobní látky, což znamená první jamka bez viditelného růstu mikroorganismu [23,28].

7.4.2.2. Provedení testu ke stanovení minimální inhibiční koncentrace antibiotik (MIC)

Prvním krokem ke stanovení MIC je potřeba nejprve rozmrazit mikrotitrační destičky, které obsahují MH agar s rozdílnými koncentracemi antibiotik v jamkách, při pokojové teplotě. Následně vytvoříme suspenzi v bujónu z narostlé kultury. Do prázdné Petriho misky, asi do poloviny, této misky nalijeme fyziologický roztok, kam poté vlijeme vytvořenou suspenzi a pečlivě promícháme. Tuto směs poté inokulujeme pomocí replikátoru do mikrotitrační destičky a následně inkubujeme při 37°C po dobu 24 – 48 hodin, poté tento test vyhodnocujeme [23,28].

<u>Název antibiotika</u>	<u>Obsah ATB</u>
Ampicilin	0,5 - 64 µg
Ampicilin/ Sulberazon	0,25 - 32 µg
Cefazolin	1 - 128 µg
Cefuroxim	0,5 - 64 µg
Cefotaxim	0,5 - 64 µg
Gentamicin	0,25 - 32 µg
Cotrimoxazol	1 - 128 µg
Colistin	0,25 - 32 µg
Kyselina oxolinová	0,5 - 64 µg
Ofloxacin	0,125 - 16 µg
Tetracyklin	0,25 - 32 µg
Aztreoam	0,25 - 16 µg
Piperacilin	1 - 128 µg
Piperacilin/ Tazobactant	0,5 - 64 µg
Cefoperazom	0,5 - 64 µg
Cefotaxim	0,125 - 16 µg
Ceftazidim	0,25 - 32 µg
Cefepim	0,063 - 8 µg
Cefoperazom/Sulberazon	0,25 - 32 µg
Meropenem	0,25 - 32 µg
Ciprofloxacin	0,063 - 8 µg
Tigecyklin	0,063 - 8 µg
Tobramycin	0,25 - 32 µg
Amikacin	0,5 - 32 µg

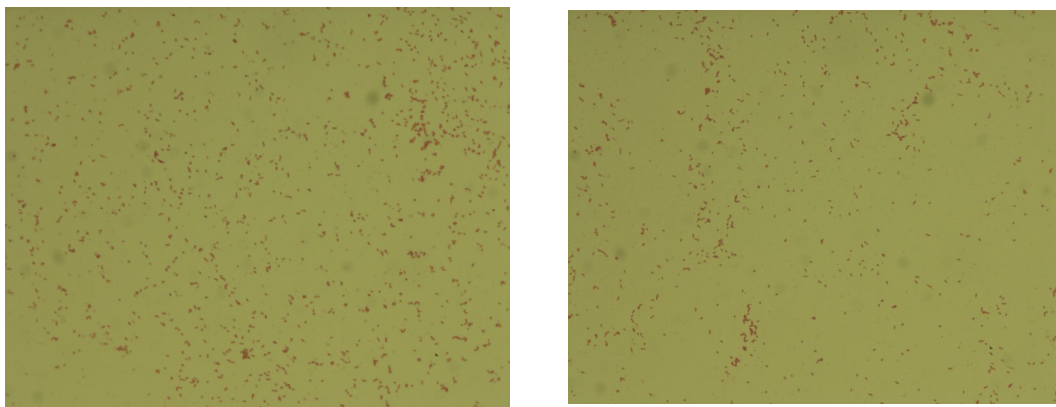
Tabulka č. 17 – Přehled antibiotik a rozmezí jejich koncentrací obsažených v mikrotitračních destičkách používaných pro stanovení MIC

8 Výsledky

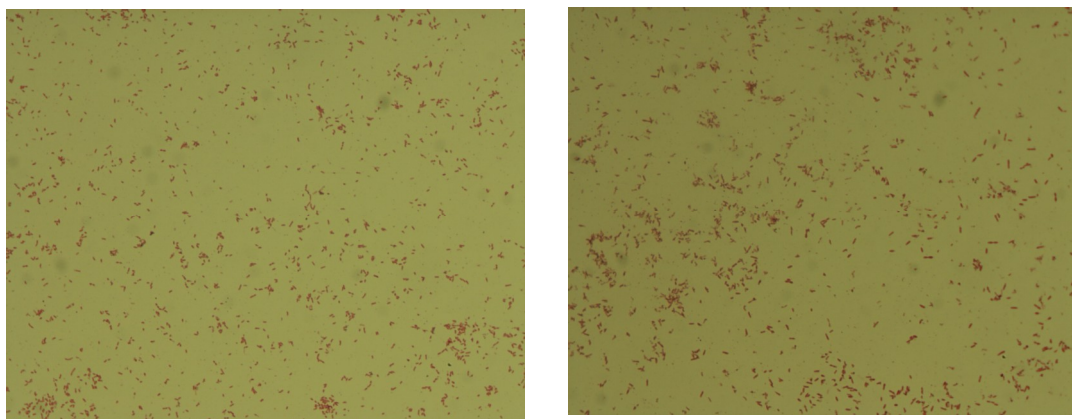
8.1 Mikroskopický průkaz

8.1.1 Mikroskopický průkaz rodu *Pandoraea*

Referenční kmeny a klinické izoláty, byly nakultivovány ze zamražených kmenů na MH agaru po dobu 48 hodin při teplotě 37°C. Narostlé kultury byly následně obarveny podle Grama. Obarvený preparát jsem pozorovala při zvětšení 100x, kde bylo možné pozorovat drobné gramnegativní kokobacily až tyčinky.



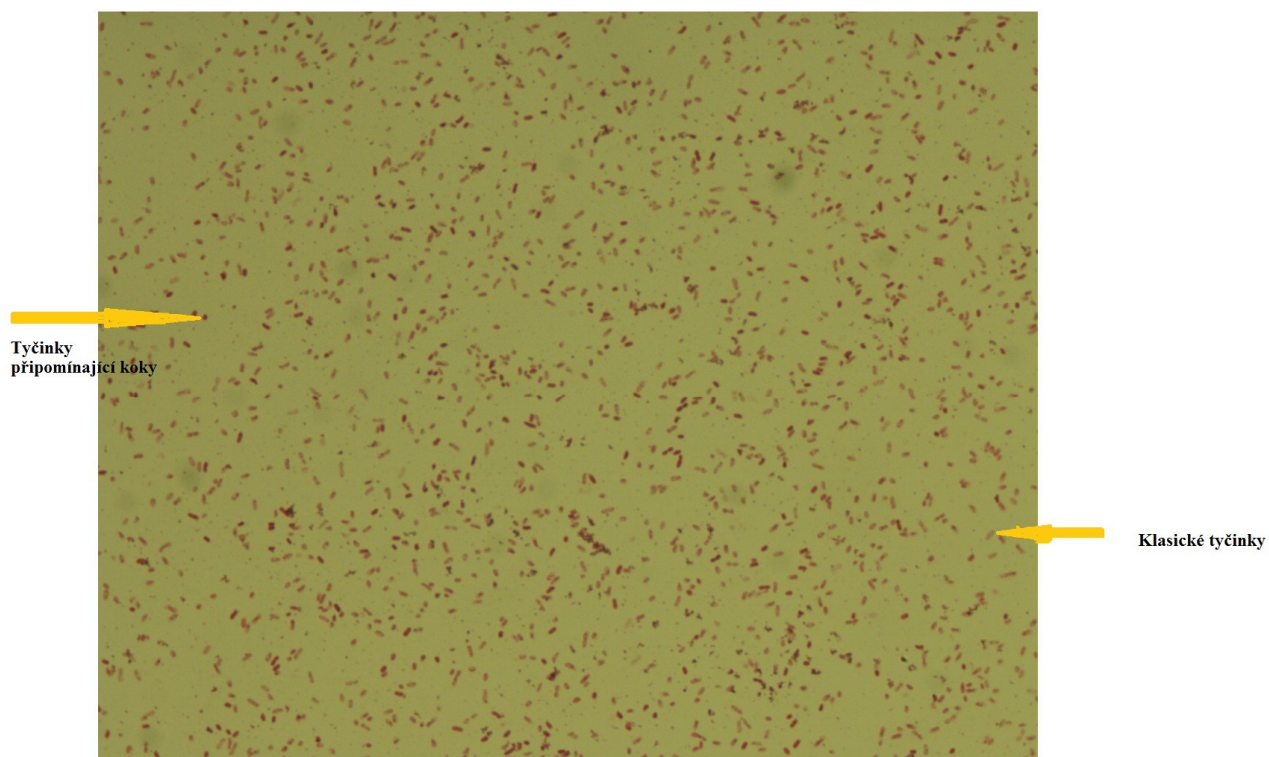
Obrázek 8. Gram negativní tyčinky, v tomto případě zástupce *Pandoraea apista* (referenční kmen LMG 16407) –vlevo a *Pandoraea pulmonicola* (referenční kmen LMG 18106) - vpravo



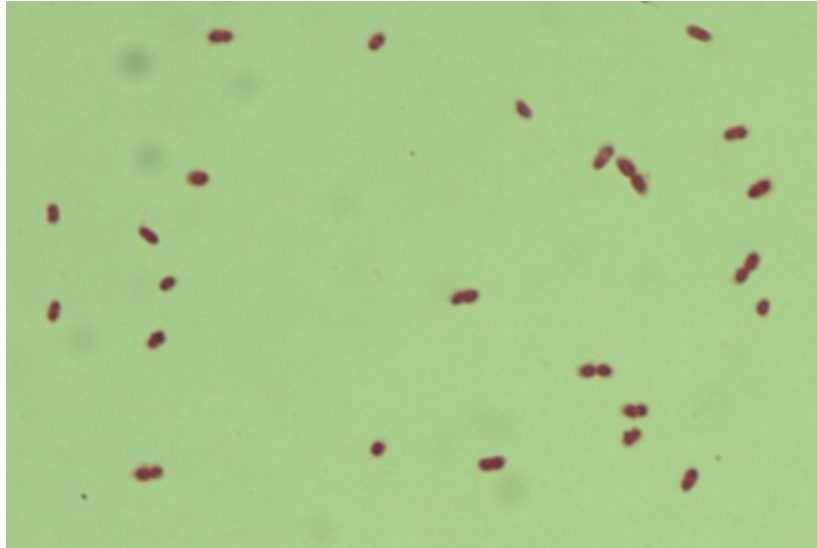
Obrázek 9. Gram negativní tyčinky, v tomto případě zástupce *Pandoraea pnomensusa* (referenční kmen LMG 18087) –vlevo a *Pandoraea sputorum* (referenční kmen LMG 18819) - vpravo

8.1.2 Mikroskopický průkaz rodu *Inquilingus*

Rod *Inquilingus* referenční kmen i klinický izolát byly pozorovány po kultivaci 48 hodin na MH agaru při teplotě 37°C. Preparáty z narostlé kultury byly následně obarveny pomocí Grama a poté pozorovány při zvětšení 100x. Pod mikroskopem byly v preparátu přítomny dva typy tyčinek, u prvního typu jsme mohli pozorovat kratší tyčinky, které svým vzhledem připomínaly spíše koky au druhého typu jsme mohli vidět drobnou, protáhlou tyčinku. U klinického izolátu (klinický izolát *I. limosus* 550) byly pozorovány větší a silnější tyčinky než u referenčního kmene (*I. limosus* LMG 20952).



Obrázek 10. Gramnegativní tyčinky rodu *Inquilingus* (zástupce *Inquilingus limosus*)

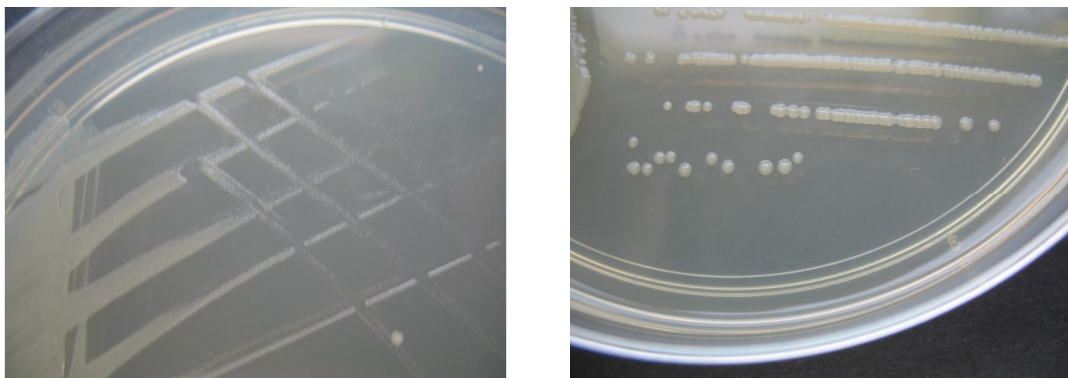


Obrázek 11. Gramnegativní tyčinky, klinický izolát *Inquilinus limosus* (klinický izolát 550), na obrázku jsou přítomny viditelně větší gramnegativní tyčinky než byly pozorovány u referenčního kmene *I. limosus* (referenční kmen *Inquilinus limosus* LMG 20952)

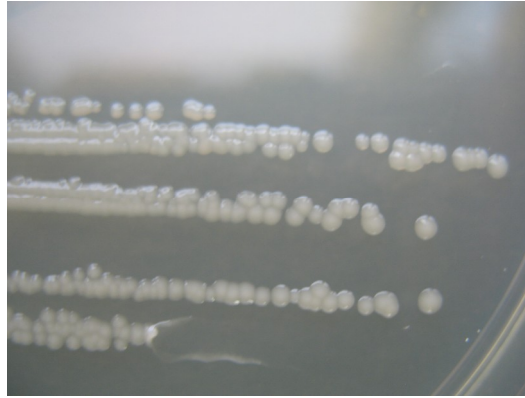
8.2 Kultivační průkaz

8.2.1 Kultivační průkaz - *Pandoraea*

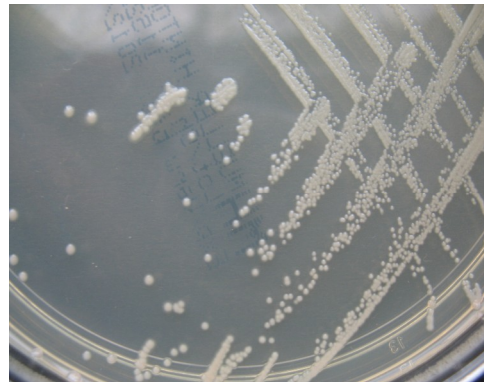
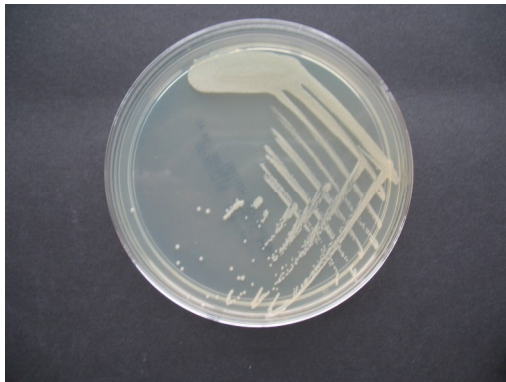
Zamražený referenční kmen *Pandoraea apista* byl kultivován při teplotě 22°C, 30°C, 37°C a 42°C a u vybraných druhů byla provedena kultivace při teplotě 37- 42°C na MH agaru. (*P. apista*, *P. pnomenusa*, *P. pulmonicola*). Na MH agaru byl růst pozorován ve formě malých, drobných, hladkých kolonií s pravidelnými okraji, které byly mléčně zakaleny .



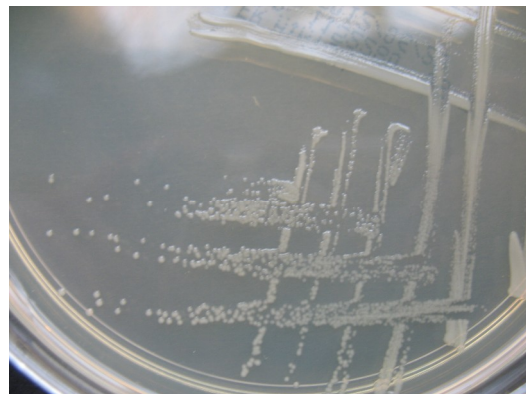
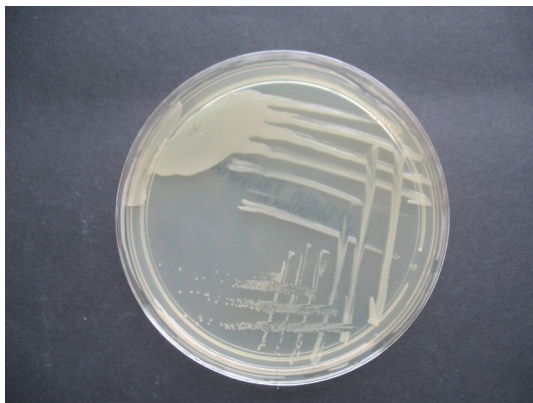
Obrázek 12. Růst referenčního kmene *Pandoraea apista* (LMG 16407) při různých teplotách 22°C (obrázek vlevo) a 30°C (obrázek vpravo)



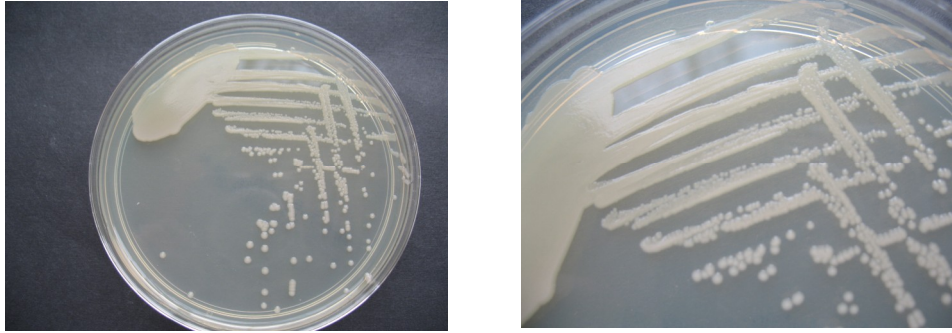
Obrázek 13. Růst referenčního kmene *P. apista* (LMG 16407) při teplotě 42°C (obrázek vlevo) a 37°C (obrázek vpravo- *detail*)



Obrázek 14. Růst referenčního kmene *P. pnomenusa* (LMG 18087) při teplotě 42°C (obrázek vpravo - *detail*)

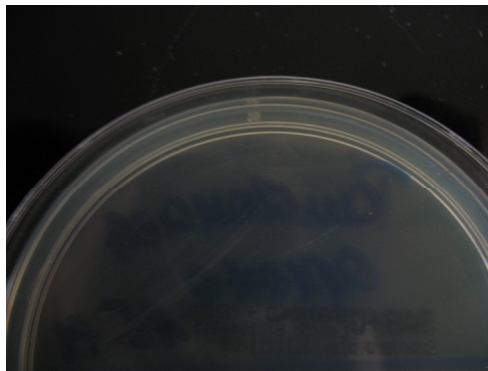


Obrázek 15. Růst referenčního kmene *P. pulmonicola* (LMG 18106) při teplotě 42°C (obrázek vpravo - *detail*)



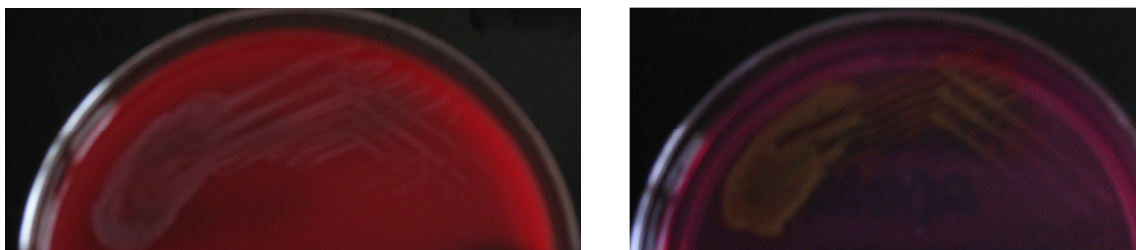
Obrázek 16. Růst referenčního kmene *P. sputorum* (LMG 18819) při teplotě 37°C (obrázek vpravo - *detail*)

Kultivace při 37°C po dobu 48 hodin, byla prováděna rovněž na krevním agaru, Endově půdě a Sabouraudově agaru. U žádného kmene *Pandoraea* sp. nebyl prokázán růst na Sabouraudově agaru.



Obrázek 17. Referenční kmen *Pandoraea apista* (LMG 16407) nerostl na Sabouraudově agaru při 37°C ani po 48 hodinové kultivaci

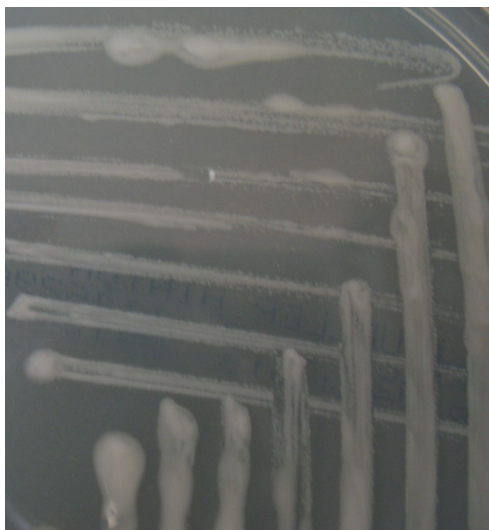
Na krevním agaru rostla *P. apista* v podobě šedivých, suchých, drobných kolonií bez viridace či hemolýzy. Na Endově půdě *P. apista* rostla ve formě drobných, hladkých kolonií s kovovým leskem.



Obrázek 18. Růst referenčního kmene *P. apista* (LMG 16407) na krevním agaru (vlevo) a Endově půdě (vpravo) při 37°C

8.2.2 Kultivační průkaz - *Inquilingus*

Referenční kmen *Inquilingus limosus* (LMG 20952) byl kultivován při 37°C a 42°C po dobu 48 hodin na MH agaru. Kolonie kmene *I. limosus* měly dvojitý charakter růstu, některé kolonie byly suché, drobné, mléčně zakalené s pravidelnými okraji, naproti tomu druhý typ kolonií se projevil růstem vypouklých mukózních kolonií s nepravidelnými okraji.



Obrázek 19. Na obrázku můžeme vidět růst referenčního kmene *I. limosus* (LMG 20952) při 37°C a dvojitý typ růstu - mukózní i hladké kolonie

8.3 Průkaz oxidázy a katalázy testu

8.3.1 Průkaz oxidázy a katalázy - *Pandoraea*

Test na průkaz oxidázové aktivity byl prováděn pomocí diagnostických proužků od firmy ITtest. U všech testovaných referenčních kmenů i klinických izolátů byla reakce negativní. Katalázový test byl u všech referenčních kmenů i u klinických izolátů pozitivní.

<i>Referenční kmen</i>	<i>Oxidáza</i>	<i>Kataláza</i>
<i>Pandoraea apista</i> (276)	negativní	pozitivní
<i>Pandoraea sputorum</i> (277)	negativní	pozitivní
<i>Pandoraea pulmonicola</i> (278)	negativní	pozitivní
<i>Pandoraea pnomenus</i> (279)	negativní	pozitivní

Tabulka 18. Výsledky oxidázového a katalázového testu u referenčních kmenů

<i>Klinický izolát</i>	<i>Oxidáza</i>	<i>Kataláza</i>
<i>Pandoraea pnomenusa (461)</i>	negativní	pozitivní
<i>Pandoraea apista (470)</i>	negativní	pozitivní
<i>Pandoraea pnomenusa (527)</i>	negativní	pozitivní
<i>Pandoraea pnomenusa (533)</i>	negativní	pozitivní
<i>Pandoraea apista (543)</i>	negativní	pozitivní

Tabulka 19. Výsledky oxidázového a katalázového testu u klinických izolátů

8.3.2 Průkaz oxidázy a katalázy- *Inquilinus*

Test na průkaz oxidázové aktivity byl prováděn pomocí diagnostických proužků od firmy ITest, jako v předešlém případě u rodu *Pandoraea*. Oxidázový test byl u referenčního kmene i klinického izolátu *Inquilinus limosus* pozitivní. Katalázový test se u referenčního kmene i u klinického izolátu byl negativní.

<i>Referenční kmen/klinický izolát</i>	<i>oxidáza</i>	<i>kataláza</i>
<i>Inquilinus limosus (282) ref. kmen</i>	pozitivní	negativní
<i>Inquilinus limosus (550) klin. izolát</i>	pozitivní	negativní

Tabulka 20. Výsledky oxidázového a katalázového testu u referenčních i klinických izolátů

8.4 Selektivní průkaz rodu *Pandoraea*

8.4.1 Selektivní průkaz kmene *Pandoraea apista* s použitím kmene

Burkholderia cepacia

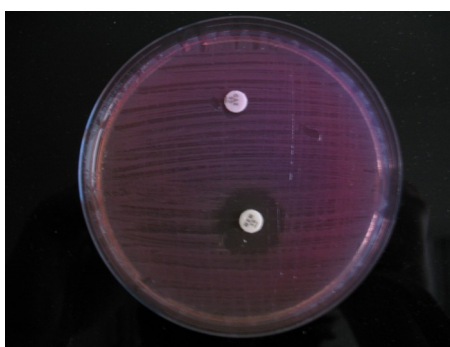
Důvodem pro selektivní kultivaci kmenů *Pandorea* sp. je jejich nápadná fenotypová podobnost a lehká zaměnitelnost s kmeny *B. cepacia* komplexu. Směs druhů *P. apista* a *B. cepacia* byla naočkována na pevné MH medium s disky antibiotik meropenem a ceftazidim (více informací viz kapitola 7.2.3.1.). Po proběhlé kultivaci směsi kmenů po dobu 48 hodin při 37°C, u disku ceftazidim a meropenem se nevytvořila žádná zóna inhibice.

Z okolí antibiotického disku meropenem a ceftazidim byla provedena izolace na MH agar a následně vyhodnocena pomocí přístroje MALDI- TOFF, který provedené izolace vyhodnotil jako *P. apista* (skórem analýzy MALDI- TOF bylo v rozmezí 2,2 - 2,4).



Obrázek 20. Směs *P. apista* a *B. cepacia* kultivované na MH agaru s antibiotickými disky ceftazidim a meropenem – na obrázku je vidět, že po kultivaci trvajícím 48 hodin při 37°C nedošlo k vytvoření zóny inhibice ani u jednoho antibiotika

Na BC selektivním agaru, kde podmínky kultivace byly stejné jako v předešlém případě, se vytvořila zóna inhibice pouze u antibiotického disku meropenem, jejíž velikost byla 20 mm. V zóně inhibice u antibiotického disku meropenem byly přítomny drobné kolonie, ze kterých byla udělána izolace na MH agar. U disku ceftazidim se zóna inhibice nevytvořila. Izolace z okolí antibiotického disku ceftazidim a meropenem, byla analyzována na přístroji MALDI- TOFF, která byla vyhodnocena jako *P. apista* (skóre analýzy MALDI- TOF bylo v rozmezí 2,2 -2,4)



Obrázek 21. Směs *P. apista* a *B. cepacia* kultivované na BC selektivním agaru s antibiotickými disky ceftazidim a meropenem – na obrázku je vidět vytvořená zóna o velikosti 20 mm v okolí antibiotického disku meropenem, zatímco u antibiotického disku obsahující ceftazidim se žádná zóna nevytvořila

8.4.2 Selektivní průkaz kmene *Pandoraea apista* z klinického materiálu

Směs *P. apista* a klinického vzorku (sputum) byla kultivována při teplotě 37°C po dobu 48 hodin na MH agaru. Ve sputu pacienta s CF před přidáním *Pandoraea apista* byly nalezeny tyto mikroorganismy : viridující streptokoky, *Candida species* a *Neisserie* sp.. V okolí disků meropenem a ceftazidim se po proběhlé kultivaci vytvořily inhibiční zóny o velikostech meropenem – 33 mm a ceftazidim - 24 mm. Z kolonií narostlých v inhibičních zóně byla provedena izolace na MH agar. Tato narostlá kultura byla následně analyzována na přístroji MALDI- TOF, podle níž se v okolí obou disků vyskytovala pouze *P. apista* (skóre analýzy MALDI- TOF bylo v rozmezí 1,9 -2,4) .



Obrázek 22. Směs kmene *P. apista* s komenzálními bakteriemi z klinického vzorku kultivované na MH agaru s antibiotickými disky meropenem a ceftazidim – na obrázku je vidět vytvořená inhibiční zóna o velikosti 33 mm v okolí disku obsahující meropenem a 24 mm v okolí disku ceftazidimu.

Opět směs kmene *P. apista* s komenzálními bakteriemi z klinického vzorku u toho samého pacienta jako v předešlém případě, byla kultivována při stejných podmínkách, ale tentokrát na BC selektivním agaru. Zóna inhibice se vytvořila pouze u antibiotického disku meropenem a to o velikosti 21 mm. Z okolí tohoto disku byla udělána izolace na MH agar, jelikož v zóně inhibice byly přítomny drobné kolonie. Druhý den byla izolace postoupena analýze na přístroji MALDI- TOF. Výsledky této analýzy potvrdily, že v okolí disku meropenem, se vyskytuje pouze kmen *Pandoraea apista* (skóre analýzy MALDI- TOF bylo v rozmezí 1,9 -2,4).

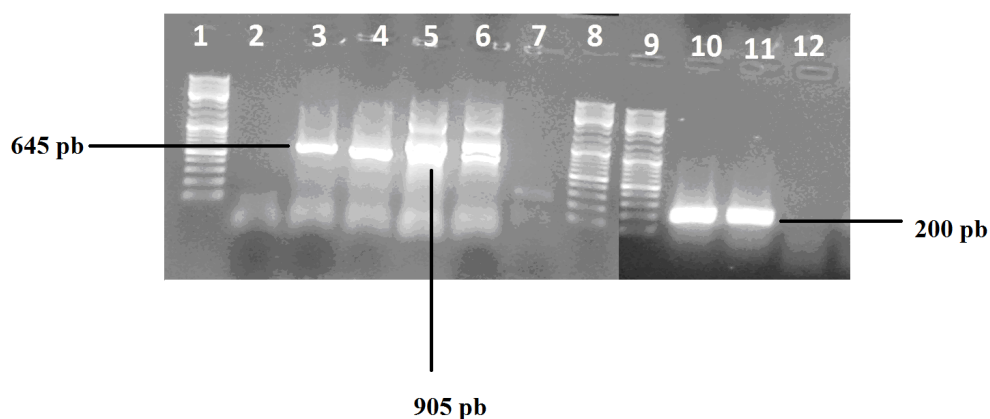


Obrázek 23. Směs kmene *P. apista* s komenzálními bakteriemi z klinického vzorku kultivované na BC selektivním agaru s antibiotickými disky meropenem a ceftazidim – na obrázku je vidět inhibiční zóna, která se vytvořila v okolí disku meropenem (21 mm)

8.5 Genotypová identifikace

8.5.1 Genotypová identifikace rodu *Pandoraea*

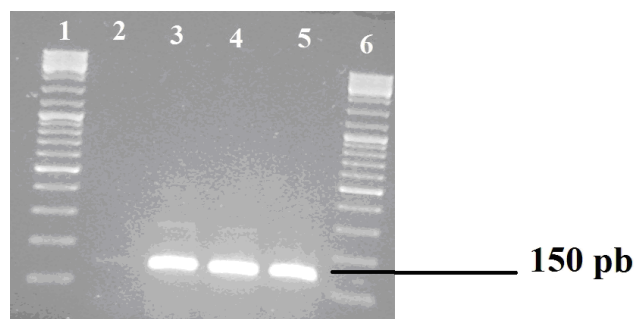
Genotypová identifikace metodou amplifikace genu pro 16S rRNA, byla prováděna pomocí publikovaných primerů PanF, PanR, AppuF, a originálně navržených primerů Pan326 a Pan530 (viz tabulka 14 v kapitole 6.6). Specifický fragment DNA pro rod *Pandoraea* měl velikost 645 bp, pro *P. apista* a *P. pulmonicola* měl velikost 905 pb a pro *P. apista* měl velikost 200 pb. Pomocí PCR s použitím těchto primerů bylo možné identifikovat referenční kmeny a klinické izoláty na úrovni rodu a zároveň u vybraných druhů (*P. apista* a *P. pulmonicola*) na úrovni druhu. Kromě biochemických, fenotypových a růstových vlastností můžeme použít k identifikaci tohoto potencionálního patogenu tudíž i tuto metodu PCR.



Obrázek 24. Genotypová identifikace pomocí amplifikace genu pro 16S rRNA
Legenda: 1- marker molekulových hmotností, 2- negativní kontrola, 3- primery PAN F/PAN R (amplikon 645pb), 4- primery PAN F/PAN R (amplikon 645pb), 5- primery AppuF/ Pan R (amplikon 905pb), 6- primery AppuF/ Pan R (amplikon 905pb), 7- negativní kontrola, 8- marker molekulových hmotností, 9- marker molekulových hmotností, 10- primery Pan 326/ Pan 530 (amplikon 200pb), 11- primery Pan 326/ Pan 530 (amplikon 200pb), 12- negativní kontrola

8.5.2 Genotypová identifikace rodu *Inquilinus*

Genotypová identifikace amplifikací genu pro 16S rRNA, byla prováděna pomocí primerů *il1r* a *il1d* (viz tabulka 14 v kapitole 6.6). Specifický fragment DNA referenčního kmene *Inquilinus limosus* měl velikost 150 bp. Kromě biochemických, fenotypových a růstových vlastností můžeme použít k identifikaci tohoto potenciálního patogenu i tuto metodu PCR.



Obrázek 25. Genotypová identifikace pomocí amplifikace genu pro 16S rRNA
Legenda: 1- marker molekulové hmotnosti, 2 - negativní kontrola, 3 - *il1d/il1r* (150pb), 4- *il1d/il1r* (kolem 150pb), 5 - *il1d/il1r* (kolem 150pb), 6- marker molekulové hmotnosti

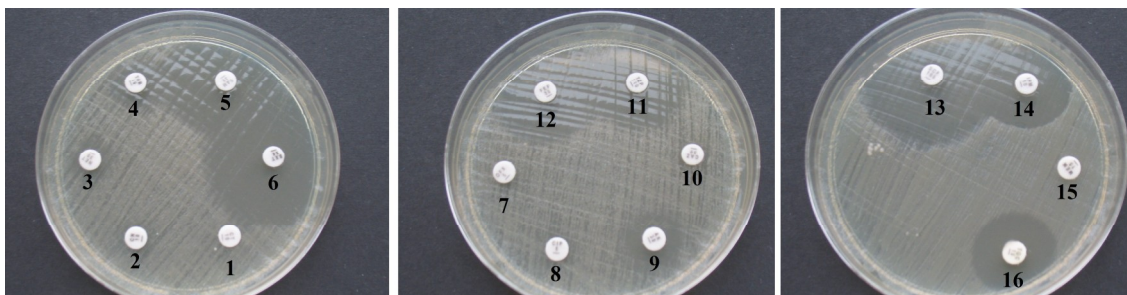
8.6 Stanovení citlivosti k antibiotikům

8.6.1 Stanovení citlivosti k antibiotikům difúzním diskovým testem – rod *Pandoraea*

Kmeny byly kultivovány 48 hodin při teplotě 37°C na MH agaru. Velikosti inhibičních zón *P. apista* a *P. sputorum* a jejich interpretace (po 48 hodinové kultivaci při teplotě 37°C na MH agaru, jsou zaznamenány v *Tabulce 21.*, na *Obrázku 26.* můžeme vidět citlivost *P. apista*

<u>Referenční druhy - Pandoraea</u>	<u>P. apista</u>		<u>P.sputorum</u>	
<u>Antibiotika</u>	<u>IZ (mm)</u>	<u>C/ R</u>	<u>IZ (mm)</u>	<u>C/R</u>
1 - Colistin	6	R	6	R
2 - Gentamicin	6	R	6	R
3 - Netilmicin	12	R	6	R
4 - Tobramycin	14	R	6	R
5 - Ampicilin/ Sulbactam	33	C	28	C
6 - Kotrimoxazol	28	C	31	C
7 - Ofloxacin	6	R	6	R
8 - Ciprofloxacin	6	R	6	R
9 - Amikacin	17	C	6	R
10 - Ceftazidim	6	R	6	R
11 - Piperacilin/ Tazobactam	28	C	14	R
12 - Cefepim	29	C	6	R
13 - Cefoperazon/Sulbactam	40	C	35	C
14 - Imipenem	27	C	27	C
15 - Meropenem	6	R	6	R
16 - Tigecyklin	22	C	16	R

Tabulka 21. Velikosti inhibičních zón u zástupce - *Pandoraea apista* , *Legenda:* IZ – inhibiční zóna, C – citlivý, R- rezistentní, zvýrazněna antibiotika (ceftazidim a meropenem) použitá k selektivnímu průkazu



Obrázek 26. Velikost inhibičních zón antibiotických disků u kmene *P. apista*, kde můžeme vidět citlivá tato antibiotika - 1. obrázek – tobramycin (4), který má zde vytvořenou inhibiční zónu, ale je rezistentní, ampicilin/sulbaktam (5), cotrimoxazol (6), 2. obrázek – amikacin (9), piperacilin/ tazobactam (11), cefepim (12), 3. obrázek - cefoperazon/ sulbactam (13) , imipenem (14) a tigecyklin (16)

Velikosti inhibičních zón *P. pulmonicola* a *P. pnomenusu* a jejich interpretace po 48 hodinové kultivaci při teplotě 37°C na MH agaru, jsou zaznamenány v *Tabulce 22.*

Referenční druhy - <i>Pandoraea</i>	<i>P. pulmonicola</i>		<i>P.pnomenusu</i>	
<i>Antibiotika</i>	IZ (mm)	C/ R	IZ (mm)	C/R
1 - Colistin	6	R	6	R
2 - Gentamicin	6	R	6	R
3 - Netilmicin	12	R	6	R
4 - Tobramycin	14	R	6	R
5 - Ampicilin/ Sulbactam	33	C	28	C
6 - Kotrimoxazol	28	C	31	C
7 - Ofloxacin	6	R	6	R
8 - Ciprofloxacin	6	R	6	R
9 - Amikacin	17	C	6	R
10 - Ceftazidim	6	R	6	R
11 - Piperacilin/ Tazobactam	28	C	14	R
12 - Cefepim	29	C	6	R
13 - Cefoperazon/Sulbactam	40	C	35	C
14 - Imipenem	27	C	27	C
15 - Meropenem	6	R	6	R
16 - Tigecyklin	22	C	16	R

Tabulka 22. Velikost inhibičních zón - *P. pulmonicola*, *P. Pnomenusu*. *Legenda:* IZ- inhibiční zóna C – citlivý, R- rezistentní, růžové zvýraznění - antibiotika použitá k selektivnímu průkazu

8.6.2 Stanovení citlivosti k antibiotikům metodou minimální inhibiční koncentrace (MIC) – *Pandoraea apista*

Odečet minimální inhibiční koncentrace byl proveden po 24 i 48 hodinách. Odečtené hodnoty jsou zaznamenány v *Tabulce 23*.

<u>Antibiotika</u>	<u>Odečtené hodnoty MIC (24 hod)</u>	<u>Odečtené hodnoty MIC (48 hod)</u>	<u>Citlivý/ Rezistentní</u>
Ampicilin	> 64	> 64	R
Ampicilin/ Sulbactam	2	2	C
Cefazolin	> 64	> 64	R
Cefuroxim	32	32	R
Cefotaxim	64	32	R
Gentamicin	32	16	R
Cotrimoxazol	1	1	C
Colistin	> 32	> 32	R
Kyselina oxolinová	> 64	> 64	R
Ofloxacin	16	16	R
Tetracyklin	8	16	R
Aztreoam	> 16	> 16	R
Piperacilin	128	128	R
Piperacilin/ Tazobactam	128	64	R
Cefoperazom	> 64	> 64	R
Cefotaxim	1	1	C
Ceftazidim	> 16	> 16	R
Cefepim	16	16	R
Cefoperazom/Sulbactam	2	2	C
Meropenem	> 32	> 32	R
Ciprofloxacín	> 16	> 16	R
Tigecyklin	1	2	C
Tobramycin	16	32	R
Amikacin	> 32	> 32	R

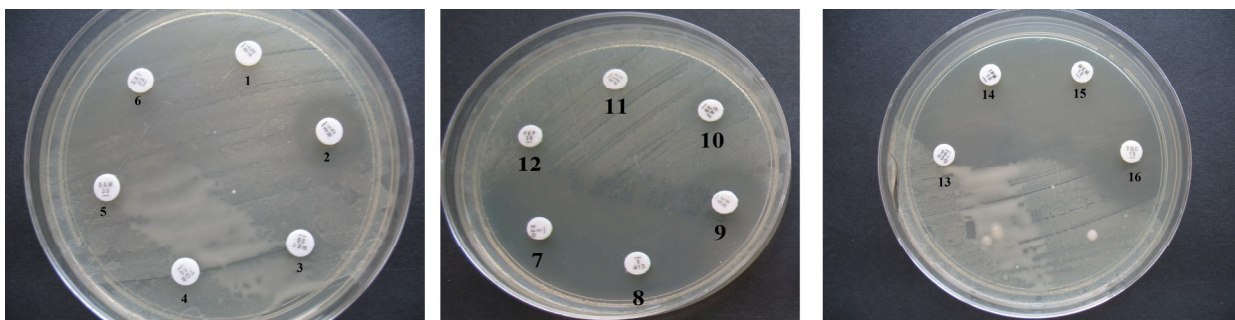
Tabulka 23. Odečtené hodnoty ze stanovení citlivosti k antibiotikům metodou minimální inhibiční koncentrace (MIC), *Legenda:* C – citlivý, R- rezistentní

8.6.3 Stanovení citlivosti k antibiotikům difúzním diskovým testem – *Inquilinus limosus*

Velikosti inhibičních zón *I. limosus* a jejich interpretace po proběhlé 48 hodinové kultivaci při 37°C jsou zaznamenány v *Tabulce 24.* na *Obrázku 26.* můžeme vidět citlivost *I. limosus*

<u>Antibiotika</u>	<u>Zkratka</u>	<u>Odečtené hodnoty</u>	<u>R/ C</u>
1 - Colistin	CT 10	6	R
2 - Gentamicin	CN 10	18	C
3 - Netilmicin	NET 30	6	R
4 - Tobramycin	TOB 10	6	R
5 - Ampicilin/ Sulbactam	SAM 20	6	R
6 - Kotrimoxazol	SXT 25	6	R
7 - Ofloxacin	OFX 5	30	C
8 - Ciprofloxacin	CIP 5	27	C
9 - Amikacin	AK 30	19	C
10 - Ceftazidim	CAZ 30	6	R
11 - Piperacilin/ Tazobactam	TZP 110	6	R
12 - Cefepim	FEP 29	6	R
13 - Cefoperazon/Sulbactam	SCF 105	6	R
14 - Imipenem	IMP 10	50	C
15 - Meropenem	MEM 10	46	C
16 - Tigecyklin	TGC 15	50	C

Tabulka 24. Odečtené hodnoty inhibičních zón ze stanovení citlivosti k antibiotikům pomocí difuzního diskového testu, *Legenda:* C – citlivý, R- rezistentní, x- nevyhodnoceno



Obrázek 26. Velikost inhibičních zón antibiotických disků u kmene *Inquilinus limosus*, kde můžeme vidět citlivá tato antibiotika - 1. obrázek – gentamicin (2), 2. obrázek – ofloxacin (7), ciprofloxacin (8), amikacin (9), 3. obrázek - cefoperazon/sulbactan (13) - nebylo možné vyhodnotit, imipenem (14), meropenem (15), tigecyklin (16)

9 Diskuze

Předmětem této studie bylo zavedení diagnostiky nově se objevujících se potencionálních patogenů, jako jsou zástupci rodu *Pandoraea* a *Inquilinus*, kteří způsobují u některých pacientů s CF zhoršení klinického stavu a u jiných pacientů s tímto onemocněním zůstávají pacienti bez klinických projevů. Předmětem studia, jak teoretického, tak i praktického byly fenotypové a genotypové vlastnosti rodů *Pandoraea* a *Inquilinus*, které by mohly sloužit jak jejich identifikaci z bakteriální kultury tak k včasnému průkazu přímo z klinického materiálu.

Rod *Pandoraea*. Mikroskopií kultury, která byla obarvena klasickým diagnostickým barvením dle Grama, jsme se přesvědčili, že se opravdu jedná o drobné gramnegativní bakterie. Tyto tyčinky velikostně odpovídají 0,5 – 4 μm [11]. V případě identifikace, není však mikroskopický průkaz signifikantní, bakterie nemají charakteristický vzhled, který by je pomohl odlišit od jiných gramnegativních tyčinek. Růstové vlastnosti, na které odkazuje odborná literatura, byly také prokázány [11,13]. Růst jsme testovali při několika teplotách (22°C, 30°C, 37°C, 42°C) a to po dobu 24 – 48 hodin. Kultivace trvající pouze 24 hodin byla nedostačující, a proto byla prodloužena na 48 hodin, kdy kmeny tvořily kolonie 2 -3 mm velké. Při teplotě 37°C rostly na MH agaru doře všichni zástupci tohoto rodu. Kolonie byly drobné, hladké, mléčně zakalené s pravidelnými okraji. *P. pnomenus*, *P. pulmonicola* a *P. apista*, je možné také kultivovat při teplotě 42°C [13], kdy kolonie rostly obdobným způsobem jako v předchozím případě. Jako vhodné kultivační medium se neosvědčilo použití Sabouradova agaru s obsahem gentamicinu, na kterém studované kmeny nerostly.

P. apista je ze 64% oxidáza pozitivní, *P. pulmonicola*, která by měla být také oxidáza pozitivní podle odborných článků [11,13], byla ale při našem testování určena jako oxidáza negativní. Pro její testování se používá řada modifikací oxidázového testu. Tyto rozdíly mohly být tudíž ovlivněné použitím jedné z modifikace testu. U všech zástupců rodu *Pandoraea* byl pozitivní katalázový test.

Rod *Pandoraea* je v mnoha případech chybně identifikován jako *B. cepacia* [11]. Z toho důvodu jsme hledali, rozdíly mezi těmito dvěma druhy bakterií, které by se mohly následně využít při navržení nové diagnostické půdy. Stanovením citlivosti k antibiotikům bylo zjištěno, že všechny kmeny z rodu *Pandoraea* jsou rezistentní k těmto antibiotikům – gentamicin, netilmicin, tobramycin, colistin,

ceftazidim a meropenem. U *B. cepacia* je většina těchto antibiotik také rezistentní, až na ceftazidim a meropenem, z čehož jsme vycházeli při selektivním průkazu. Předmětem testování selektivního průkazu, bylo si ověřit zde naše hypotéza, že pokud by se přidala antibiotika, která jsou rezistentní u rodu *Pandoraea* a zároveň citlivá u *B. cepacia*, by po přidání do běžného živného agaru, mohla sloužit k selektivnímu průkazu rodu *Pandoraea*. Referenční kmeny bylo opravdu možné izolovat z okolí disku meropenem a ceftazidim, ze směsi jak *B. cepacia* komplexu tak ze vzorků sputa s přítomnými komenzálními bakteriemi.

Ke genotypovému určení rodu *Pandoraea* metodou sekvenace 16S rDNA jsem použila jednak primery, které byly již v předchozích letech použity v jiných studiích [11] a primery pro druh *P. apista*, které jsem si sama navrhla na základě sekvence strukturálního genu pro 16S rDNA. Amplifikace genu pro 16S rDNA je vhodnou metodou pro diagnostiku tohoto rodu, i když některé studie uvádějí, že právě touto metodou nemusí být některé druhy rozeznány dokonale, a proto doporučují použití sekvenace genu pro gyrázu *gyrB* [14].

Rod *Inquilinus*. Mikroskopií kultury, která byla obarvena klasickým diagnostickým barvením dle Grama, bylo opět potvrzeno, že se jedná o drobnou gramnegativní tyčinku. Mikroskopie je metodou, která i v tomto případě je nespecifická, kvůli podobnosti s jinými bakteriemi ze skupiny gramnegativních nefermentujících tyčinek, jako jsou například zástupci rodu *Pseudomonas* [16].

Růst kmenů *Inquilinus* sp. je podle literatury možný při 25- 42°C [15], druh *Inquilinus limosus* jsme kultivovali jen při teplotě 37°C po dobu 48 hodin. Jeho růst je charakteristický výskytem dvou typů kolonií [16], a to mukózních, které mohou být díky své podobnosti s *P. aeruginosa* chybně identifikovány [17] a drobných suchých kolonií. Některé studie uvádějí, že mukózní typ růstu přispívá ke kolonizaci pacientů s CF [18]. Oba dva typy kolonií byly pozorovány i v této studii.

I. limosus, je popisován jako kataláza a oxidáza pozitivní [15,16]. V této studii jsme také testovali oxidázovou a katalázovou aktivitu, kdy test na oxidázu byl stejně, jak uvádějí i jiné studie pozitivní, kdežto katalázová aktivita na rozdíl zahraničních článků nebyla prokázána, což by mohlo být z důvodu mukózního růstu *I. limosus*, kdy mukózní kolonie neobsahují dostačující množství bakterií.

Stanovení citlivosti k antibiotikům, ukázalo studované kmeny jako rezistentní ke colistinu, penicilinům, cefalosporinům a monobaktamům a mezi citlivá antibiotika s velkou zónou inhibice patřily také imipenem a ciprofloxacin [16]. Výsledky stanovení

citlivosti k antibiotikům byly obdobné jako v zahraniční literatuře, kde se imipenem doporučuje jako antibiotikum první volby v léčbě pacientů s CF se zážným klinickým průběhem této infekce.

Ke genotypové identifikaci kmene *I. limosus* metodou 16S rRNA, byly použity již známé primery [18]. Genotypová identifikace pomocí amplifikace genu pro 16S rRNA je tedy také vhodnou senzitivní a specifickou metodou pro stanovení a průkaz bakteriálního druhu, kterého etiopatogeneze a epidemiologie je zatím pouze málo prozkoumána.

10 Závěr

Analýza fenotypových a molekulárně-biologických vlastností a stanovení kvalitativní a kvantitativní citlivosti k antibiotikům rodu *Pandoraea* přinesl řadu nových poznatků, které by mohly pomoci při včasné diagnostice a tudíž navržení adekvátní léčby infikovaných pacientů s CF. K diagnostice kmenů z rodu *Pandoraea* mohou být používány metody molekulárně-biologické a dále také metoda selektivního průkazu pomocí nově navržené izolační plotny. Navržení selektivní kultivace je vhodná pro kultivaci klinických izolátů *Pandorae* sp. ze vzorků pacientů s CF. Zavedená byla rovněž i genotypová identifikace kmenů z rodu *Pandoraea* a *Inquilinus* pomocí již známých nebo originálně navržených primerů. Tyto metody umožní průkaz těchto bakteriálních patogenů, které dosud unikají pozornosti mikrobiologické diagnostiky. Pomocí standardizovaných metod je možné stanovit jejich citlivost k antibiotikům a pacienty specificky léčit.

11 Referenční seznam

1. VÁVROVÁ, Věra a kol. *Cystická Fibróza*. Praha: Grada Publishing a.s., 2006. 516 s. ISBN 80-247-0531-1.
2. VÁVROVÁ, Věra a kol. *Cystická fibróza: Příručka pro nemocné a jejich rodiče*. 2. vyd. Příbram: Professional Publishing, 2009. 165s. ISBN 978-80-7431-000-3.
3. MAČÁK, Jirka a Jana MAČÁKOVÁ. *Patologie*. Praha: Grada Publishing, a.s., 2004. 348 s. ISBN 80-247-0785-3.
4. <http://emedicine.medscape.com/article/1001602-overview>
5. GREENWOOD, David et al. *Lékařská mikrobiologie: Přehled infekčních onemocnění: patogeneze, imunita, laboratorní diagnostika a epidemiologie*. Praha: Grada Publishing, spol. s.r.o., 1999. 690 s. ISBN 80-7169-365-0.
6. COUTINHO, Henrique et al. *Pulmonary bacterial pathogens in cystic fibrosis patients and antibiotic therapy: a tool for the health workers. International Archives of Medicine*. 2008, roč. 1, č. 1, s. 24-. ISSN 1755-7682. DOI: 10.1186/1755-7682-1-24.
7. BEDNÁŘ, Marek. *Lékařská mikrobiologie: bakteriologie, virologie, parazitologie*. Vyd. 1. Praha: Marvil, 1996, 558 s. ISBN 80-238-0297-6.
8. ATKINSON, R. M. et al. *Chronic Colonization with *Pandora* species in Cystic Fibrosis Patients Determined by Repetitive-Element-Sequence PCR*. *Journal of Clinical Microbiology*. 2006-03-03, roč. 44, č. 3, s. 833-836. ISSN 0095-1137. DOI: 10.1128/JCM.44.3.833-836.2006.
9. COENYE, T. et al. *Identification of *Pandora* Species by 16S Ribosomal DNA-Based PCR Assays*. *Journal of Clinical Microbiology*. 2001-12-01, roč. 39, č. 12, s. 4452-4455. ISSN 0095-1137. DOI: 10.1128/JCM.39.12.4452-4455.2001.

10. JØRGENSEN, I. M. et al. *Epidemic spread of Pandoraea apista, a new pathogen causing severe lung disease in cystic fibrosis patients. Pediatric Pulmonology.* 2003, roč. 36, č. 5, s. 439-446. ISSN 8755-6863. DOI: 10.1002/ppul.10383.
11. COENYE, T. et al. *Description of Pandoraea gen. nov. with Pandoraea apista sp. nov., Pandoraea pulmonicola sp. nov., Pandoraea pnomenusa sp. nov., Pandoraea sputorum sp. nov. and Pandoraea norimbergensis comb. Nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* 2000, roč. 50, č. 2, s. 887-899
12. SEGONDS, Christine. *Use of amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis for Identification of Ralstonia and Pandoraea Species: Interest in Determination of the Respiratory Bacterial Flora in Patients with Cystic Fibrosis. Journal of Clinical Microbiology.* 2003, roč. 41, č. 7, s. 3415-3418. DOI: 10.1128/JCM.41.7.3415-3415-3418.2003.
13. PIMENTEL, J. D. et al. *Misidentification of Pandoraea sputorum Isolated from Sputum of a Patient with Cystic Fibrosis and Review of Pandoraea Species Infections in Transplant Patients. Journal of Clinical Microbiology.* 2008-09-03, roč. 46, č. 9, s. 3165-3168. ISSN 0095-1137. DOI: 10.1128/JCM.00855-08.
14. COENYE, Tom et al. *Use of the gyrB gene for the identification of Pandoraea species.* ISBN 10.1111/j.1574-6968.2002.tb11053.x.
15. COENYE, T. et al. *Characterization of Unusual Bacteria Isolated from Respiratory Secretions of Cystic Fibrosis Patients and Description of Inquilinus limosus gen. nov., sp. nov. Journal of Clinical Microbiology.* 2002-06-01, roč. 40, č. 6, s. 2062-2069. ISSN 0095-1137. DOI: 10.1128/JCM.40.6.2062-2069.2002.
16. CHIRON, R. et al. *Clinical and Microbiological Features of Inquilinus sp. Isolates from Five Patients with Cystic Fibrosis. Journal of Clinical Microbiology.* 2005-08-04, roč. 43, č. 8, s. 3938-3943. ISSN 0095-1137. DOI: 10.1128/JCM.43.8.3938-3943.2005.

17. WELLINGHAUSEN, Nele et al. *Inquilinus limosus in patients with cystic fibrosis, Germany. Emerging infectious diseases EID*. 2005, roč. 11, č. 3, s. 457-459. ISSN 1080-6059.
18. BITTAR, Fadi, et al. *Inquilinus limosus and Cystic Fibrosis. Emerging infectious diseases EID*. 2008, č. 6, s. 993-995. ISSN 1080-6059.
19. HAYES, Don, et al. *Mucoid Inquilinus limosus in a young adult with cystic fibrosis. Pediatric Pulmonology*. 2009, roč. 44, č. 6, s. 619-621. ISSN 87556863. DOI: 10.1002/ppul.21003.
20. SCHMOLDT, S., et al. *Clonal analysis of Inquilinus limosus isolates from six cystic fibrosis patients and specific serum antibody response. Journal of Medical Microbiology*. 2006-10-01, roč. 55, č. 10, s. 1425-1433. ISSN 0022-2615. DOI: 10.1099/jmm.0.46466-0.
21. DEGAND, N., et al. *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for Identification of Nonfermenting Gram-Negative Bacilli Isolated from Cystic Fibrosis Patients. Journal of Clinical Microbiology*. 2008-10-03, roč. 46, č. 10, s. 3361-3367. ISSN 0095-1137. DOI: 10.1128/JCM.00569-08.
22. VOTAVA, Miroslav. *Lékařská mikrobiologie obecná*. Brno: Neptun, 2001, 247 s. ISBN 80-902-8962-2.
23. VOTAVA, Miroslav a kol. *Lékařská mikrobiologie II.: Přehled vyšetřovacích metod v lékařské mikrobiologii*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2000, 309 s. ISBN 80-210-2272-8.
24. HAVLIŠ, Jan. Hmotnostní spektrometrie MALDI TOF. *Vesmír*. 1999, roč. 78, s. 448. (<http://www.vesmir.cz/clanek/hmotnostni-spektrometrie-maldi-tof>)
25. DOLEŽALOVÁ, Věra a kol. *Laboratorní technika v klinické biochemii a toxikologii*. 4. přeprac. vyd. Brno: IDVPZ, 1995, 286 s. ISBN 80-701-3198-5.

26. PRITCHARD, D a Bruce R KORF. *Základy lékařské genetiky*. 1. české vyd. Praha: Galén, 2007, 182 s. ISBN 978-807-2624-492.

27. KOČÁREK, Eduard. *Molekulární biologie v medicíně*. 1. vyd. Brno: Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotnických oborů, 2007, 218 s. ISBN 978-80-7013-450-4.

28. URBÁŠKOVÁ, Pavla a kol. *Vyšetření pro antimikrobiální terapii*. 1. vyd. Praha: Avicenum, 1985. 150 s. Mikrobiologické vyšetřovací metody; Sv. 2.

29. http://fv1.vfu.cz/sekce_ustavy/mikrobiologie/mikrobiologie_pro_farmaceuty/praktikum04/index.html