

Univerzita Karlova v Praze

2. lékařská fakulta

Studijní program: Biomedicína



RNDr. Šárka Vošahlíková

**Molekulární epidemiologie a vlastnosti bakteriálních původců infekcí plic
u pacientů s cystickou fibrózou**

**Molecular epidemiology and characteristics of bacterial pathogens
on lung infection in patients with cystic fibrosis**

Dizertační práce

Vedoucí závěrečné práce/Školitel: Doc. RNDr. Alexandr Nemeč, Ph. D.

Praha, 2014

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze své práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze dne 30. června 2014

Šárka Vošahlíková

Podpis:

IDENTIFIKAČNÍ ZÁZNAM

VOŠAHLÍKOVÁ, Šárka. *Molekulární epidemiologie a vlastnosti bakteriálních původců infekcí plic u pacientů s cystickou fibrózou. [Molecular epidemiology and characteristics of bacterial pathogens of lung infection in patients with cystic fibrosis]*. Praha, 2014. 95 stran, 3 přílohy. Dizertační práce (Ph.D.). Univerzita Karlova v Praze, 2. lékařská fakulta, Laboratoř molekulární genetiky, Laboratoř bakteriální genetiky/ Pediatrická klinika 2. LF UK, Laboratoř bakteriální genetiky/ Státní Zdravotní Ústav. Vedoucí závěrečné práce Alexandr Nemeč.

Klíčová slova: cystická fibróza, *Pseudomonas aeruginosa*, komplex *Burkholderia cepacia*, epidemický kmen, druhová identifikace, kmenová typizace

Key words: cystic fibrosis, *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* complex, epidemic strain, species identification, strain typing

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

2. LÉKAŘSKÁ FAKULTA

Laboratoř molekulární genetiky

STÁTNÍ ZDRAVOTNÍ ÚSTAV

CENTRUM EPIDEMIOLOGIE A MIKROBIOLOGIE

Laboratoř bakteriální genetiky

Molekulární epidemiologie a vlastnosti bakteriálních původců
infekcí plic u pacientů s cystickou fibrózou

RNDr. Šárka Vošahlíková

Dizertační práce

2014

Oborová rada: Molekulární a buněčná biologie, genetiky a virologie

Školitel: Doc. RNDr. Alexandr Nemeč, Ph. D.

Školitel konzultant: Doc. MUDr. Pavel Dřevínek, Ph. D.

Pracoviště: Laboratoř molekulární genetiky, 2. lékařská fakulta, Univerzita Karlova
v Praze

Laboratoř bakteriální genetiky, Centrum epidemiologie a mikrobiologie,
Státní Zdravotní Ústav, Praha

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych zde vyslovila poděkování doc. RNDr. Alexandru Nemcovi, Ph.D., který byl v letech 2005-2009 mým konzultantem a od roku 2009 školitelem. Za možnost dokončit svou dizertační práci, jeho cenné rady, zkušenosti a v neposlední řadě i přátelský přístup a trpělivost.

Dále pak doc. MUDr. Pavlu Dřevínkovi, Ph.D., za skvělou spolupráci, neocenitelné rady a pomoc během naší společné práce a ochotu být mým konzultantem v letech od roku 2009.

Doc. MUDr. Ondřeji Cinkovi, Ph.D., který byl mým školitelem v letech 2005-2009, za možnost vypracovat svoji práci v Laboratoři molekulární genetiky, Pediatrické kliniky 2. LF a FN v Motole, za cenné rady a zkušenosti, které jsem během spolupráce s ním získala.

Celému kolektivu Laboratoře molekulární genetiky Pediatrické kliniky, 2. LF a FN v Motole za možnost být jeho součástí a za přátelskou atmosféru, v níž jsem mohla pracovat.

Kolektivu Laboratoře bakteriální genetiky, Centra epidemiologie a mikrobiologie, Státního Zdravotního Ústavu za pomoc během mé práce, milý a přátelský přístup k mé osobě.

Poděkování patří i mým současným kolegyním Mgr. Lence Sadílkové, Ph.D. a RNDr. Ireně Moserové, Ph.D. za pomoc a pochopení při dokončování mé práce.

Závěrem bych chtěla vyjádřit poděkování své rodině a přátelům za pomoc, trpělivost a podporu během mého studia a velké pochopení pro mou práci.

OBSAH

PROHLÁŠENÍ	6
IDENTIFIKAČNÍ ZÁZNAM	7
PODĚKOVÁNÍ	10
OBSAH	6
SEZNAM ZKRATEK	8
SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ JSOU SOUČÁSTÍ TÉTO PRÁCE	10
1. SOUHRN	11
2. SUMMARY	13
3. CYSTICKÁ FIBRÓZA A GRAMNEGATIVNÍ PATOGENY RESPIRAČNÍHO TRAKTU	15
3.1. Cystická fibróza	15
3.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	16
3.2.1. Klinický průběh infekce <i>P. aeruginosa</i> u pacientů s CF	17
3.2.2. Prevalence infekce vyvolaná <i>P. aeruginosa</i> a epidemické kmeny	18
3.2.3. Separace pacientů s epidemickým kmenem <i>P. aeruginosa</i>	19
3.3. Komplex <i>Burkholderia cepacia</i>	20
3.3.1. Klasifikace bakterií komplexu <i>B. cepacia</i>	21
3.3.2. Epidemiologie komplexu <i>B. cepacia</i>	22
3.3.3. Epidemický kmen <i>B. cenocepacia</i> J2315	23
3.3.4. Epidemický kmen CZ1	24
3.3.5. Genom komplexu <i>B. cepacia</i>	25
3.4. Metody detekce a typizace bakteriálních patogenů	26
3.5. Situace v pražském centru pro léčbu CF	29
3.5.1. Diagnostika komplexu <i>B. cepacia</i>	29
3.5.2. Diagnostika <i>P. aeruginosa</i>	30
4. CÍLE	31
5. MATERIÁLY A METODY	32
5.1. Studium vlastností a klonálních vazeb izolátů <i>P. aeruginosa</i> získaných od pacientů pražského centra pro léčbu CF	32
5.1.1. Identifikace izolátů <i>P. aeruginosa</i> , extrakce DNA a vyšetření citlivosti na antimikrobní látky.....	32
5.1.2. Analýza genetické diverzity	32
5.2. Identifikace a typizace bakterií komplexu <i>B. cepacia</i> pomocí MLST z klinického materiálu pacientů s CF bez nutnosti kultivační pozitivitu	34
5.2.1. MLST	34
5.3. Studium inzerčních sekvencí u <i>B. cenocepacia</i> a vliv stresových podmínek na jejich přeskupování	35
5.3.1. RFLP a Southern hybridizace	35

5.3.2. Vystavení bakteriálních izolátů účinkům sériového pasážování	- 36 -
5.3.3. Expozice bakteriálních izolátů účinkům peroxidu vodíku.....	- 36 -
5.3.4. Vystavení bakteriálních izolátů podmínkám teplotního šoku.....	- 37 -
5.3.5. Makrorestrikční analýza s následnou separací v pulzním elektrickém poli – PFGE.....	- 37 -
5.3.6. Detekce <i>ISBcen20</i> u kmene J2315	- 37 -
6. VÝSLEDKY.....	- 39 -
6.1. Studium vlastností a klonálních vazeb izolátů <i>P. aeruginosa</i> získaných od pacientů pražského centra pro léčbu CF	- 39 -
6.1.1. Vzorky pacientů s CF infikovaných <i>P. aeruginosa</i>	- 39 -
6.1.2. AFLP	- 39 -
6.1.3. Makrorestrikční analýza s následnou separací v pulzním elektrickém poli.....	- 40 -
6.1.4. Vyšetření antibiotické citlivosti <i>P. aeruginosa</i>	- 43 -
6.2. Identifikace a typizace bakterií komplexu <i>B. cepacia</i> pomocí MLST z klinického materiálu pacientů s CF bez nutnosti kultivační pozitivivity	- 44 -
6.2.1. Soubor testovaných vzorků komplexu <i>B. cepacia</i>	- 44 -
6.3. Studium inzerčních sekvencí u <i>B. cenocepacia</i> a vliv stresových podmínek na jejich přeskupování	- 48 -
6.3.1. Soubor testovaných bakteriálních kmenů	- 48 -
6.3.2. RFLP a Southern hybridizace	- 48 -
6.3.3. Vliv stresových podmínek na přesun <i>ISBcen20</i>	- 51 -
6.3.4. Přemísťování <i>ISBcen20</i> u kmene J2315 (ST 28).....	- 51 -
7. DISKUZE	- 53 -
7.1. Studium vlastností a klonálních vazeb izolátů <i>P. aeruginosa</i> získaných od pacientů pražského centra pro léčbu CF	- 53 -
7.2. Identifikace a typizace bakterií komplexu <i>B. cepacia</i> pomocí MLST z klinického materiálu pacientů s CF bez nutnosti kultivační pozitivivity	- 55 -
7.3. Studium inzerčních sekvencí <i>B. cenocepacia</i> a vliv stresových podmínek na jejich přemísťování	- 57 -
8. ZÁVĚR	- 60 -
9. LITERATURA	- 62 -
10. PŘÍLOHY	- 76 -
Příloha č. 1.....	- 76 -
Příloha č. 2.....	- 83 -
Příloha č. 3.....	- 88 -

SEZNAM ZKRATEK

AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism analysis, polymorfizmus délky amplifikovaných fragmentů
Bc	<i>Burkholderia cepacia</i>
Bcc	<i>Burkholderia cepacia</i> complex, komplex <i>Burkholderia cepacia</i>
BCSA	<i>Burkholderia cepacia</i> selective agar, kultivační médium
BSM	Basal Salt Medium, kultivační médium
cblA	Gen pro tzv. „cable – pili“
cci	<i>Burkholderia cenocepacia</i> island, ostrov patogenicity
CF	Cystická fibróza
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator, transmembránový regulátor vodivosti
ddNTP	dideoxynukleotid trisfosfát
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic acid, deoxyribonukleová kyselina
dNTP	Deoxyribonukleotid trisfosfát
EcoRI	Restrikční endonukleáza izolovaná z <i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid, kyselina ethylendiamintetraoctová
ERIC-PCR	Enterobacterial Repetitive Intergenic Sequence-based Polymerase Chain Reaction, genotypizační metoda založená na amplifikaci oblastí ohraničených repetitivními elementy
ET12	<i>Burkholderia cenocepacia</i> – elektroforetický typ 12, epidemická linie popsaná na základě multilokusové enzymové elektroforézy
FN	Fakultní nemocnice
gyrB	Gen pro gyrázu B
IS	Inzerční sekvence
ISBcen	Inzerční sekvence <i>Burkholderia cenocepacia</i>
LB médium	Lysogeny broth, kultivační médium
LES	Liverpool Epidemic Strain
LF	Lékařská fakulta
LMG	Laboratoř molekulární genetiky
LPS	Lipopolysacharid
MLST	Multilocus Sequence Typing, multilokusová sekvenční typizace

<i>MseI</i>	Restrikční endonukleáza získaná z <i>Micrococcus</i> sp.
<i>mucA</i>	Gen pro produkci alginátu u <i>P. aeruginosa</i>
NaCl	chlorid sodný
OD	Optická denzita
<i>oprL</i>	Gen pro lipoprotein vnější membrány komplexu <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PCR	Polymerase Chain Reaction, polymerázová řetězová reakce
PFGE	Pulsed Field Gel Electrophoresis, makrorestrikční analýza s následnou separací fragmentů v pulzním elektrickém poli
<i>phaC</i>	Acetoacetyl-CoA reduktáza
QS	Quorum Sensing, mechanismus mezibuněčné komunikace, který umožňuje bakterii vnímat a reagovat na změny v denzitě bakterií v daném okolí
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA assay, náhodná amplifikace polymorfních úseků DNA
<i>recA</i>	Gen pro rekombinázu A
REP	Repetitive Elements Sequence, repetitivní extragenové palindromové elementy
REP-PCR	Repetitive Sequence-Based Polymerase Chain Reaction, metoda používaná pro rychlou identifikaci mikroorganismů
RNA	Ribonucleic acid, ribonukleová kyselina
ROS	Reactive Oxygen Species, reaktivní formy kyslíku
rpm	Revolutions Per Minute; otáčky za minutu
<i>rpoB</i>	Gen pro beta podjednotku RNA polymerázy
rRNA	Ribozomální ribonukleová kyselina
ST	Sequence Type; sekvenční typ
TBE	Tris – Borate – EDTA, pufr
TBS	Tris – Buffered Saline, pufr
TrisHCl	Kyselina trischlorovodíková
TSA	Tryptic Soy Agar, trypton – sojový agar
TSB	Tryptic Soy Broth, trypton – sojový bujon

SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ JSOU SOUČÁSTÍ TÉTO PRÁCE

Vosahlikova S, Drevinek P, Cinek O, Pohunek P, Maixnerova M, Urbaskova P, van den Reijden TJK, Dijkshoorn L, Nemeč A*: High genotypic diversity of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from patients with cystic fibrosis in the Czech Republic. *Research in Microbiology* (2007), 158 (4), 324-329.

Pohunek P*, Zemková D, Brázová J, Vošahlíková Š, Vávrová V: Infekce bakteriemi *Pseudomonas aeruginosa* u nemocných cystickou fibrózou. Možnosti diagnostiky a klinické výstupy tříleté studie. *Česko-slovenská pediatrie* (2007), 62 (9): 527-533.

Drevinek P*, Baldwin A, Lindenberg L, Joshi TL, Marchbank A, Vosahlikova S, Dowson ChG, Mahenthalingam E: Oxidative stress of *Burkholderia cenocepacia* induces insertion sequence mediated genomic rearrangements that interfere with macrorestriction based genotyping. *Journal of Clinical Microbiology*. (2010), 48 (1), 34–40.

Drevinek P*, Vosahlikova S, Dedeckova K, Cinek O, Mahenthalingam E: Direct culture-independent strain typing of *Burkholderia cepacia* complex in sputum samples from patients with cystic fibrosis. *Journal of Clinical Microbiology*. (2010), 48 (5), 1888–1891.

* Korespondenční autor

1. SOUHRN

Cystická fibróza (CF) je nejčastější autozomálně recesivně dědičné onemocnění v kavkazské populaci. Toto onemocnění je způsobeno poruchou proteinového kanálu, který zajišťuje přenos chloridových iontů skrz apikální cytoplazmatickou membránu. Přestože tato porucha zasahuje různé orgány, je postižení dýchacího systému nejzávažnější. Porušením iontové rovnováhy dochází v dýchacích cestách k tvorbě hustého a vazkého hlenu, který brání odstranění prachových částic a bakterií. Hlavní komplikací CF jsou bakteriální infekce respiračního traktu, které přecházejí do chronicity a jsou nejčastější příčinou progresivního respiračního selhání a předčasného úmrtí. Nejvýznamnější původci těchto infekcí jsou *Pseudomonas aeruginosa* a bakterie komplexu *Burkholderia cepacia* (*Bcc*). Chronické infekce způsobené těmito organizmy jsou prakticky nevyléčitelné. Situaci u těchto bakterií komplikuje výskyt epidemických kmenů, jež se přenášejí mezi pacienty. Prevence šíření infekcí u pacientů s CF závisí na přesné a časně bakteriologické diagnostice původce na druhové a kmenové úrovni a na důsledné aplikaci protiepidemických opatření, která jsou založena především na izolaci pacientů podle jejich mikrobiologického nálezu.

Cílem této dizertační práce bylo definovat epidemiologii infekcí způsobených *P. aeruginosa* a *Bcc* u pacientů pražského centra pro CF s důrazem na aplikaci moderních genotypizačních technik. Práce navazuje na již dříve dosažené výsledky, zvláště na zavedení molekulárně genetické diagnostiky *Bcc* (Drevinek P. et al., 2002) a *P. aeruginosa* a odhalení přítomnosti vysoce epidemického kmene *Burkholderia cenocepacia* CZ1 v české populaci pacientů s CF (Drevinek P. et al., 2005).

Výsledky dosažené v předkládané dizertační práci lze shrnout do tří hlavních bodů:

- (1) Pomocí genotypizačních technik bylo vyloučeno epidemiologicky významné rozšíření přenosných kmenů *P. aeruginosa* mezi pacienty s CF. Pro typizaci izolátů *P. aeruginosa* byly využity fingerprintové metody s vysokým rozlišením, polymorfismus délky amplifikovaných fragmentů (AFLP) a makrorestrikční analýza genomové DNA (PFGE).
- (2) Byla zavedena a úspěšně aplikována metoda multilokusové sekvenční typizace (MLST), která umožňuje přesnou identifikaci bakteriálních izolátů *P. aeruginosa* a *Bcc* na kmenové úrovni porovnáním sekvencí sedmi provozních genů. Protokol pro MLST byl následně upraven za účelem diagnostiky bakterií *Bcc* přímo z klinického materiálu.
- (3) Byly prostudovány genomy kmenů *Bcc* CZ1 a J2315 s ohledem na inzerční sekvence (IS), které mohou být příčinou odlišných makrorestrikčních profilů genomové DNA u izolátů se

shodným profilem podle MLST. Simulací různých stresových podmínek bylo prokázáno přeskupování IS v genomu CZ1.

2. SUMMARY

Cystic fibrosis is the most abundant inherited autosomal recessive disease in Caucasian population. Cystic fibrosis is caused by a dysfunction of transport channel which is responsible for transport of chloride ions on the apical side of the plasma membrane. Despite the fact that the dysfunction of the transport channel is present in several organs, the most severely affected one is the respiratory system. Because of the ion imbalance thick sticky mucus is produced on the surface of the airways which then prevents the removal of dust particles and bacteria. The main complications of cystic fibrosis are the bacterial infections of the respiratory system which become chronic during the patient life and thus are the most common causes of the respiratory failure and premature death. The most important sources of these infections are *Pseudomonas aeruginosa* and strains of the *Burkholderia cepacia* complex (*Bcc*). Infections caused by these bacteria are practically untreatable and serious complications arise from the existence of epidemic strains which can be transferred from patient to patient. Precise and fast diagnostics of pathogenic strains is a critical step to avoid spreading bacterial infections as well as strictly followed anti-epidemic strategies mainly based on isolation of cystic fibrosis patients according to their microbiology diagnostic results.

The aim of this PhD thesis was to define the epidemiology of infections caused by *P. aeruginosa* a *Bcc* in cystic fibrosis patients of Prague Center for cystic fibrosis with focus on application of modern genotyping techniques. This thesis follows up the previous work, mainly the establishment of molecular and genetic diagnostics of *Bcc* (Drevinek P. et al., 2002) and *P. aeruginosa* and the discovery of highly epidemic strain of *Burkholderia cenocepacia* CZ1 in the population of Czech cystic fibrosis patients (Drevinek P. et al., 2005).

The obtained results of the thesis can be summarized in three main points:

- (1) The epidemiologically important transmission of strain *P. aeruginosa* was excluded in the cystic fibrosis patients by genotypisation techniques. The typing was performed using fingerprint methods with high resolution such as AFLP and macrorestriction analysis of genome DNA.
- (2) The multilocus sequence typing (MLST) method was established and successfully applied. This method allows accurate identification of bacterial isolates of *P. aeruginosa* and *Bcc* on the strain level by comparing sequences of seven housekeeping genes. The MLST protocol was subsequently modified in order to diagnose *Bcc* directly from the clinical material.

- (3) The bacterial genomes of strains *Bcc* CZ1 and J2315 were analyzed with focus on insertion sequences (IS) which could be responsible for different macrorestriction profiles of genome DNA of isolates with an identical MLST profile. By simulation of several stress conditions, IS shuffling was proven to be present in the CZ1 genome.

3. CYSTICKÁ FIBRÓZA A GRAMNEGATIVNÍ PATOGENY RESPIRAČNÍHO TRAKTU

3.1. Cystická fibróza

Cystická fibróza (CF) je jedním z nejčastějších vrozených autozomálně recesivních onemocnění, které se v kavkazské populaci vyskytuje s frekvencí jeden postižený na 3 000 narozených dětí.

Jde o multiorgánové onemocnění, jehož příčinou je mutace v obou alelách genu pro transmembránový regulátor vodivosti iontů – *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator* (CFTR). Protein kódovaný tímto genem funguje jako chloridový kanál v membráně na apikální straně buněk. Mutací v genu dochází k poruše nebo úplné dysfunkci tohoto kanálu a tím ke zvýšenému influxu sodných iontů a vzniku relativní nepropustnosti pro chloridové ionty (Roomans G.M., 2014). Pro zachování elektroneutality je tedy nadměrně absorbován sodík společně s vodou a dochází ke změně charakteru sekretů, zejména pak jejich vazkosti. To má za následek řadu klinických projevů jako je zvýšená viskozita sekretů, rekurentní obstrukce, produktivní a resorpční zánět a progresivní destrukce postižených cílových orgánů (Vávrová V., 2006).

Cystická fibróza postihuje všechny tělní systémy s výjimkou centrálního nervového systému. Časté bývá poškození jater, které v pozdějším věku může vyústit až v jaterní cirhózu, vyskytují se problémy se střevní motilitou způsobující nedostatečné vstřebávání živin, či porucha sekrece elektrolytů vedoucí k výrazně slanějšímu potu u nemocných v porovnání se zdravými jedinci. Velké ztráty solí potem (při zvýšené fyzické námaze, febrilních stavech atd.) mohou zapříčinit až těžký rozvrat vnitřního prostředí doprovázený hyponatrémií, hypochlorémií a metabolickou alkalózou. V pozdějším věku pacientů není nikterak vzácný ani diabetes mellitus, který se však od diabetu mellitu 1. a 2. typu liší především tím, že na jeho rozvoji se podílí útlak Langerhansových ostrůvků fibrotickou tkání pankreatu (Mackie A.D. et al., 2003). Reprodukční orgány jsou u většiny mužů s CF postiženy kongenitální bilaterální absencí (agenezí) vas deferens, což je příčinou obstruktivní azoospermie.

U pacientů s CF je však nejzávažněji postižen dýchací systém. Právě infekce dýchacích cest jsou hlavní příčinou zvýšené morbidity a mortality těchto pacientů. V důsledku narušeného transportu iontů dochází k poruše muciliární clearance a vzniku vazkého, hustého hlenu, který způsobuje obstrukci dýchacích cest. Díky tomu se prostředí dýchacích cest stává

ideálním místem pro rozvoj bakteriálních infekcí, které lze jen obtížně účinně odstranit (Matsui H. et al., 1998). Respirační infekce tedy často v průběhu pacientova života přecházejí do chronicity a vedou k nevratnému poškození plicní tkáně, vzniku chronické obstrukční plicní nemoci, plicnímu selhání a smrti pacienta. Americká společnost pro léčbu CF uvádí, že téměř 85 % pacientů s CF umírá v důsledku selhání plic.

Složení mikrobiální flóry dýchacích cest se do značné míry mění v průběhu infekce a to zejména v průběhu exacerbace (Twomey K.B. et al., 2013). I když plicní infekce u pacientů s CF způsobují některé běžné bakteriální druhy jako *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae* nebo *Streptococcus pneumoniae*, mohou se na nich podílet i méně obvyklé podmíněně patogenní bakterie. Jde o bakterie z komplexu *Burkholderia cepacia* (*Bcc*), *Stenotrophomonas maltophilia*, *Achromobacter xylosoxidans*, *Pandora* spp., *Ralstonia* spp., *Inquilinus limosus*, netuberkulózní mykobakterie a další druhy (Miller M.B. a Gilligan P.H., 2003; Lyczak J.B. et al., 2002; Hutchinson G.R. et al., 1996; Levy I. et al., 2008). Většina těchto mikroorganismů jsou gramnegativní tyčinky, které jsou v případě pacientů s CF rezistentní k většině používaných antibiotik a které přetrvávají v pacientově respiračním traktu navzdory agresivní a prodloužené antibiotické léčbě. Přesná identifikace bakteriálních původců infekcí spojených s CF na druhové a kmenové úrovni je tedy důležitá pro predikci klinického vývoje a k rozpoznání epidemiologické situace v populaci pacientů. Zavedením nových molekulárních metod nezávislých na kultivaci se zvýšil počet bakteriálních druhů, které byly identifikovány v materiálu z respiračního traktu pacientů s CF (Bittar F. et al., 2008; Armougom F. et al., 2009; Harris J.K. et al., 2007). Plicní mikrobiom a etiologie infekčních komplikací u pacientů s CF se tak jeví mnohem složitější, než se původně předpokládalo (Sibley C.D. et al., 2006).

3.2. *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa je gramnegativní, nesporeující, pohyblivá bakterie, v přírodě značně rozšířená. Bakteriální buňky jsou velké od 1 do 5 μm a nesou polárně umístěný bičík a pili typu IV, které jim umožňují pohyb. Nemají pouzdro, ale často jsou obklopeny slizovou vrstvou. Jde o fakultativně aerobní mikroorganismus, který může vedle kyslíku využívat i další konečné akceptory elektronů v dýchacím řetězci (nitráty, nitrity nebo N_2O) a růst tak za anaerobních podmínek. Díky této metabolické flexibilitě osidluje *P. aeruginosa* rozmanitá, především vlhká prostředí. Přirozeně se vyskytuje ve vodě a půdě, v kořenových systémech rostlin, či stolici zvířat a lidí. Tato bakterie je jedním ze tří nejčastějších původců oportunních

infekcí u lidí (Stover C.K. et al., 2000). *P. aeruginosa* zahrnuje ohromné množství více či méně klinicky významných kmenů. Způsobuje především infekce močových cest a respiračního traktu, ale i septikémie a závažné infekce u imunokompromitovaných pacientů. U zdravých osob vyvolává infekce jen vzácně, ale riziko infekce výrazně stoupá u hospitalizovaných pacientů se závažným základním onemocněním a u osob s oslabenou imunitou. Zdrojem infekcí vyvolaných *P. aeruginosa* a podmínkou jejich epidemického šíření v nemocnicích jsou vlhké pomůcky a přístroje, výlevky umyvadel a různé druhy roztoků, ve kterých tyto bakterie přežívají a množí se.

Možnost osídlení různorodých a často značně odlišných prostředí je dána kombinací metabolické rozmanitosti, minimálních nutričních požadavků a přirozené rezistence této bakterie k řadě antibiotik a dezinfekčních prostředků. Tyto vlastnosti určuje poměrně velký, adaptibilní a plastický genom (Silby M.W. et al., 2011).

Genom tvoří jeden kruhový chromozom a variabilní počet plazmidů. Velikost genomu se pohybuje v rozmezí 5,2–7 Mbp s poměrně vysokým zastoupením GC bází (65–67 %) (Klockgether J. et al., 2011). Sekvenační analýzou celých genomů nebo jejich částí bylo prokázáno, že genom *P. aeruginosa* kóduje širokou škálu transportních molekul, transkripčních regulátorů a dvousložkových regulačních systémů, které odráží metabolickou rozmanitost bakterie a její schopnost využívat širokou škálu živin. Na druhé straně je cirkulární chromozom napříč jednotlivými kmeny *P. aeruginosa* vysoce konzervovaný, interklonální různorodost byla stanovena pouze 0,5–0,7 % (Spencer D.H. et al., 2003; Lee D.G. et al., 2006; Cramer N. et al., 2011). Z toho plyne, že genomická rozmanitost je způsobena především původně extrachromozomálními elementy jako jsou plazmidy nebo úseky DNA, které jsou vloženy do různých lokusů chromozomu. Tyto variabilní části genomu mohou být přítomné u celé podskupiny populace *P. aeruginosa*, ale není vzácné, že jsou pouze záležitostí jediného kmene (Klockgether J. et al., 2007; Wiehlmann L. et al., 2007).

3.2.1. Klinický průběh infekce *P. aeruginosa* u pacientů s CF

Infekce způsobené *P. aeruginosa* zásadně zhoršují prognózu pacienta s CF. Chronická plicní infekce má charakteristický vývoj. V první dekádě pacientova života, nastává období intermitentní kolonizace *P. aeruginosa* a teprve v pozdějším věku dochází téměř u všech pacientů k vytvoření chronické infekce (Johansen H.K. a Hoiby N., 1992). Kmeny způsobující časnou a intermitentní infekci se často podobají kmenům z prostředí. Tyto kmeny nejsou mukoidní, obvykle rychle rostou a jsou citlivé na antibiotika (Murray T.S. et al., 2007; Folkesson A. et al., 2012). Po této dočasné fázi postupně dochází k přizpůsobení se *P.*

aeruginosa prostředí dýchacích cest pacienta a rozvoji chronické infekce. Adaptační změny bakterie mohou být důsledkem hypermutací probíhajících v genomu infikujících kmenů. Tyto kmeny mají nefunkční systém oprav chybného párování bází (*mismatch repair*) (Mena A. et al., 2008). Vzniklé mutace jsou pak spojeny s celou řadou fenotypových změn, jako jsou změna motility a virulence, změna v citlivosti na antibiotika a produkce velkého množství adhezínů, exopolysacharidů a sekundárních metabolitů (Cramer N. et al., 2011). Jednou z častých mutací, která je asociována s přechodem infekce do chronicity, je mutace v genu *mucA*. Tato mutace vede k přechodu nemukoidního fenotypu v mukoidní v důsledku nadprodukce alginátu (Martin D.W. et al., 1993). Mukoidní varianta *P. aeruginosa* do značné míry slouží jako ukazatel chronické a vesměs nevy léčitelné infekce a je spojována se zhoršující se funkcí plic, poškozením tkání a tedy s horší prognózou onemocnění (Pedersen S.S. et al., 1992).

3.2.2. Prevalence infekce vyvolaná *P. aeruginosa* a epidemické kmeny

Většina specializovaných center se u pacientů s CF potýká s vysokou prevalencí infekcí vyvolaných *P. aeruginosa*, která se pohybuje v rozmezí 60–80 % (de Vrankrijker A.M. et al., 2011; Aaron S.D. et al., 2010; Currie A.J. et al., 2003; Kerem E. et al., 1990b).

Do počátku 90. let minulého století se za hlavní zdroj nákazy pacientů s CF považovalo prostředí. Pacienti se infikovali unikátními, vzájemně nepříbuznými kmeny. Pouze u nepatrné části pacientů, zejména příbuzných, byl nalezen identický kmen (Grothues D. et al., 1988; Kelly N.M. et al., 1982). To, že získání infekce skrze sporadické kmeny z prostředí nemusí být jedinou možností nákazy, poprvé naznačila studie předpokládající přenos kmenů mezi pacienty s CF na základě podobnosti jejich antibiogramů (Pedersen S.S. et al., 1986). Koncem minulého století se začaly objevovat práce o přenosných, vysoce infekčních kmenech, které jsou asociovány s výraznější antibiotickou rezistencí a horším průběhem infekce (Armstrong D. et al., 2003; Jones A.M. et al., 2001; Al-Aloul M. et al., 2004; Griffiths A.L. et al., 2005). Obecně lze říci, že tyto epidemické kmeny jsou schopné přenosu mezi pacienty s CF a na celkový stav pacienta mají díky svým vlastnostem výrazně negativnější vliv než kmeny sporadické.

Prvním epidemickým kmenem *P. aeruginosa*, jehož průkaz byl proveden s využitím molekulárně genetických metod, byl kmen *Liverpool Epidemic Strain* (LES), který byl nalezen u 59 % dětských pacientů s infekcí *P. aeruginosa* navštěvujících liverpoolské centrum pro léčbu CF (Cheng K. et al., 1996). LES byl následně prokázán i mezi dospělými pacienty v Liverpoolu a okolí, kteří navštěvovali centra pro léčbu CF (Panagea S. et al.,

2003). Další studie ukázaly, že LES se vyskytuje u nemocných s CF v jiných centrech napříč Velkou Británií (Scott F.W. a Pitt T.L., 2004; Chambers D. et al., 2005; Jones A.M. et al., 2005; Kakinuma Y. et al., 2010) a je tak nejrozšířenějším epidemickým kmenem u těchto pacientů. Přestože se jedná o epidemický kmen, který je přítomen především v britských centrech pro léčbu CF, byl zjištěn též v řadě center v kanadském Ontariu (Aaron S.D. et al., 2010).

Počátkem roku 2000 byly ve Velké Británii popsány další dva epidemické kmeny *P. aeruginosa* způsobující infekce u pacientů s CF, Midlands1 a *Manchester Epidemic Strain*. Midlands1 je druhým nejčastěji se vyskytujícím kmenem po LES (Scott F.W. a Pitt T.L., 2004; Jones A.M. et al., 2001). Zdá se, že přítomnost kmene Midlands1, který nebývá vysoce rezistentní k antibiotikům a není spojen s výrazně horší prognózou pacienta, je asociována s nižším věkem pacienta v době propuknutí infekce (Chambers D. et al., 2005). Kmen *Manchester Epidemic Strain*, který je přítomen přibližně u 14 % britských pacientů s CF, je naopak charakteristický svou vysokou rezistencí vůči většině antipseudomonádových antibiotik (Jones A.M. et al., 2001).

Další epidemické kmeny byly popsány v řadě evropských i mimoevropských center. Z evropských zemí potýkajících se s výskytem epidemických kmenů *P. aeruginosa* lze jmenovat Dánsko a Holandsko, kde došlo k rozšíření epidemického kmene zřejmě v důsledku pořádání letních nebo zimních táborů pro pacienty s CF bez ohledu na jejich mikrobiologický nálezu (Ojienyi B. et al., 2000; Brimicombe R.W. et al., 2008).

Z mimoevropských zemí s výskytem epidemických kmenů *P. aeruginosa* jde o již zmíněnou Kanadu, kde byl kromě kmene LES zjištěn i epidemický kmen označený jako kmen B, z nichž polovina kmenů náležela k ST 439 (Aaron S.D. et al., 2010). V Austrálii bylo popsáno hned několik epidemických kmenů, které zodpovídají za infekce až u 55 % pacientů s CF (Armstrong D.S. et al., 2002). V roce 2005 pak byla publikována práce Romling a kolegů, která popsala epidemický kmen *P. aeruginosa* (tzv. Klon C), který byl zjištěn v několika centrech v řadě zemí na dvou kontinentech (Romling U. et al., 2005).

3.2.3. Separace pacientů s epidemickým kmenem *P. aeruginosa*

S výskytem epidemických kmenů řada center pro léčbu CF zavedla přísný systém odděleného sledování pacientů podle jejich mikrobiologického nálezu a přítomnosti multirezistentních kmenů, aby tak zabránila možnému dalšímu šíření infekce. Paralelně se zaváděním hygienicko-epidemiologických opatření se začal klást velký důraz i na časnou

a spolehlivou diagnostiku infekce a na provádění molekulárně epidemiologických šetření pro zjištění eventuální přítomnosti epidemických kmenů.

Například v liverpoolském dětském centru nedošlo po zavedení separace pacientů na základě molekulární identifikace bakteriálního kmene k žádnému novému případu infekce kmenem LES (Morris D. et al., 2009). Pokles nových případů infekcí epidemickými kmeny byl po zavedení separačního systému zaznamenán i v Austrálii, kde došlo ke snížení počtu takových infekcí zhruba o třetinu při zachování počtu nových případů infekce (Griffiths A.L. et al., 2012).

I přes doložené případy výskytu epidemických kmenů *P. aeruginosa* existují centra, která molekulárně typizačními metodami epidemický kmen nepotvrdila a za hlavní zdroj nákazy je tedy stále považováno prostředí. Tato centra proto nezavedla separační systém pacientů pozitivních na *P. aeruginosa* (Smart C.H. et al., 2006). Pokud se však epidemický kmen objeví, je zavedení a striktní dodržování separačního systému pacientů nezbytné. K rozhodnutí, zda bude separace pacientů zavedena, je nutná znalost aktuální epidemiologické situace a rozložení genotypů izolátů *P. aeruginosa* získaných od pacientů příslušného centra.

3.3. Komplex *Burkholderia cepacia*

Jak již bylo zmíněno v úvodu textu, chronické infekce plic jsou jedním z hlavních faktorů, které výrazně přispívají ke zhoršování plicních funkcí a tím k celkovému stavu pacientů s CF. Nejzávažnější a nejobávanější původce bakteriálních infekcí jsou bakterie ze skupiny označované jako komplex *Burkholderia cepacia* (*Bcc*). Tento komplex zahrnuje 18 validně pojmenovaných druhů (tab. 1). Jedná se o gramnegativní, aerobní, nesporulující tyčinky, které byly nalezeny v půdě, vlhkých prostředích, vodních rezervoárech, rhizosféře rostlin, průmyslových zařízeních, hospitalizačních centrech, ale i u imunokompromitovaných pacientů (Uehlinger S. et al., 2009).

Některé kmeny *Bcc* měly dříve biotechnologické využití. Se zvyšujícím se výskytem fytopatogenů rezistentních na pesticidy byly *Bcc* používány jako biologické agens při remediaci kontaminované půdy (Govan J.R. et al., 1996). Kmeny komplexu produkují řadu antimikrobiálních látek, jako jsou pyrrolnitriny, altericidiny a cepalyciny, které zabraňují růstu a množení bakteriálních a plísňových fytopatogenů (McLoughlin T.J. et al., 1992; Jayaswal R.K. et al., 1993). Mají též schopnost degradovat složky průmyslového odpadu a herbicidy včetně kyseliny 2,4,5-trichlorfenoxyoctové (Kilbane J.J. et al., 1982). Nicméně

zhruba ve stejné době, kdy bylo navrženo jejich zemědělské využití, se kmeny *Bcc* ukázaly jako možné oportunní patogeny u imunokompromitovaných pacientů nebo pacientů s CF (Coenye T. a Vandamme P., 2003; Mahenthiralingam E. et al., 2008; Mahenthiralingam E. et al., 2005) a od jejich využití v zemědělství se ustoupilo. Klinické projevy infekce způsobené *Bcc* se pohybují od asymptomatického nosičství až po náhlé a těžké septické stavy, které se označují jako cepacia syndrom. Následně se zjistilo, že vnější prostředí není jediným zdrojem nákazy, ale že k přenosu infekce může dojít i přenosem z pacienta na pacienta a to i nepřímo skrze kontaminované plochy a předměty. Díky tomu čelila řada center pro léčbu CF propuknutí epidemií infekcí vyvolaných *Bcc* (Bernier S.P. et al., 2008).

Přestože všechny známé druhy *Bcc*, kromě *B. ubonensis*, byly izolovány z přírodních i klinických zdrojů, nejčastějšími druhy vyskytujícími se v klinickém materiálu jsou *Burkholderia cenocepacia* a *Burkholderia multivorans* (Coenye T. a Vandamme P., 2003; Mahenthiralingam E. et al., 2008).

3.3.1. Klasifikace bakterií komplexu *B. cepacia*

Druhy náležící do *Bcc* byly popsány nejprve jako jednotný kmen, rostlinný patogen způsobující hnilobu cibule (Mahenthiralingam E. a Vandamme P., 2005). Fenotypová rozmanitost izolátů *B. cepacia* vedla k podrobným molekulárně genetickým analýzám, při kterých bylo zjištěno, že do té doby takto označované bakterie, patří do několika fenotypově neodlišitelných ale genotypově odlišných druhů, tzv. genomovarů. Původní druh *B. cepacia* byl nejprve rozdělen do pěti genomovarů (Vandamme P. et al., 1997). Na základě analýzy genu *recA* byl poté genomovar III (později pojmenovaný jako *B. cenocepacia*) rozdělen do čtyř podskupin označených IIIA–IIID. S rozvojem sekvenačních technik byl *Bcc* postupně rozšířen na současných 18 druhů (tab. 1) a vzhledem ke studiím prováděným v současnosti lze předpokládat, že nejde o konečný počet (Vandamme P. a Dawyndt P., 2011). Genomovary, tj. provizorní taxony definované pouze genotypově, se postupně nahrazují validně pojmenovanými druhy a to na základě podrobného taxonomického popisu, jenž zahrnuje i diagnostické fenotypové znaky.

Tabulka 1. Přehled druhů v rámci komplexu *B. cepacia*

<i>Burkholderia cepacia</i>	Genomovar I	(Burkholder W.H., 1950)
<i>Burkholderia multivorans</i>	Genomovar II	(Vandamme P. et al., 1997)
<i>Burkholderia cenocepacia</i>	Genomovar III	(Vandamme P. et al., 2003)
<i>Burkholderia stabilis</i>	Genomovar IV	(Vandamme P. et al., 2000)
<i>Burkholderia vietnamiensis</i>	Genomovar V	(Gillis M. et al., 1995)
<i>Burkholderia dolosa</i>	Genomovar VI	(Vermis K. et al., 2004)
<i>Burkholderia ambifaria</i>	Genomovar VII	(Coenye T. et al., 2001)
<i>Burkholderia anthina</i>	Genomovar VIII	(Vandamme P. et al., 2002)
<i>Burkholderia pyrrocinia</i>	Genomovar IX	(Vandamme P. et al., 2002)
<i>Burkholderia ubonensis</i>	Genomovar X	(Vandamme P. et al., 2002)
<i>Burkholderia latens</i>	BCC1	(Vanlaere E. et al., 2008)
<i>Burkholderia diffusa</i>	BCC2	(Vanlaere E. et al., 2008)
<i>Burkholderia arboris</i>	BCC3	(Vanlaere E. et al., 2008)
<i>Burkholderia seminalis</i>	BCC7	(Vanlaere E. et al., 2008)
<i>Burkholderia metallica</i>	BCC8	(Vanlaere E. et al., 2008)
<i>Burkholderia lata</i>	Skupina K	(Vanlaere E. et al., 2009)
<i>Burkholderia contaminans</i>	Skupina K	(Vanlaere E. et al., 2009)
<i>Burkholderia pseudomultivorans</i>	BCC9	(Peeters C. et al., 2013)

3.3.2. Epidemiologie komplexu *B. cepacia*

Přenos infekce z pacienta na pacienta byl popsán u několika druhů *Bcc*. Epidemiologické studie na konci 90. let 20. století nicméně ukázaly, že naprostá většina infekcí je způsobena *B. cenocepacia* a *B. multivorans* (Drevinek P. a Mahenthiralingam E., 2010). Přestože infekce jakýmkoli druhem *Bcc* je u pacientů s CF obvykle spojována s těžším průběhem respiračních onemocnění a horší prognózou základního onemocnění, *B. cenocepacia* se považuje za nejzávažnějšího původce těchto komplikací zejména kvůli vysoké pravděpodobnosti výskytu cepacia syndromu. Tento druh představuje vysoké riziko pro pacienty i proto, že především podskupina IIIA zahrnuje nejvíce známých epidemických kmenů (Drevinek P. et al., 2005; Speert D.P. et al., 2002; Coenye T. et al., 2002). Nejznámějším kmenem náležícím do této podskupiny je *B. cenocepacia* ET12 (*B. cenocepacia* Electrophoretic Type 12). ET12 zahrnuje, jak bylo zjištěno pomocí MLST, několik kmenů zodpovědných za závažné infekce a epidemie mezi pacienty v Kanadě, Velké

Británii a několika evropských centrech (Mahenthiralingam E. a Vandamme P., 2005). Kromě ET12 patří do *B. cenocepacia* i epidemické kmeny označované podle jejich fingerprintového profilu jako RAPD typ 01, 04 a 06, které jsou rozšířeny mezi pacienty v kanadských centrech (Speert D.P. et al., 2002). Do této podskupiny spadá i epidemický kmen CZ1 popsáný v České republice (Drevinek P. et al., 2005). Na druhou stranu, mnoho epidemických kmenů nepatří výhradně do podskupiny IIIA. Mezi dominantní kmeny vyskytujícími se mezi pacienty v USA patří Midwest clone (Coenye T. et al., 2002) a PHDC (Chen J.S. et al., 2001), které náleží do podskupiny *B. cenocepacia* IIIB (podle genu *recA*). Jejich výskyt opět není omezen pouze na Spojené státy americké, ale byly zjištěny i mezi evropskými centry pro léčbu CF. Přestože *B. cenocepacia* zůstává i nadále u pacientů s CF převažujícím původcem respiračních komplikací (Drevinek P. et al., 2005; Golini G. et al., 2006), existují centra, která uvádějí zvýšenou incidenci infekcí a přítomnost epidemických kmenů dalších druhů *Bcc* jako jsou *B. multivorans* (Baldwin A. et al., 2008; Govan J.R. et al., 2007), *B. cepacia* přítomného u více jak jedné třetiny portugalských pacientů s CF (Cunha M.V. et al., 2007). S rozvojem přesnější a snadněji proveditelné identifikace a typizace se setkáváme s epidemickými kmeny *B. contaminans* dominujícími v argentinské a španělské populaci (Martina P. et al., 2013; Medina-Pascual M.J. et al., 2012).

3.3.3. Epidemický kmen *B. cenocepacia* J2315

Prvním popsáným epidemickým kmenem *B. cenocepacia* byl již zmiňovaný kmen ET12 (ekvivalentní označení podle MLST je v současnosti ST 28). Nejznámější a nejprostudovanější je v rámci ET12 kmenová linie J2315. Tento kmen je stejně jako ostatní kmeny ET12 charakterizován přítomností genu *cblA* pro dlouhá vlákna tzv. cable pili, který je specifický pro tuto kmenovou linii (Sajjan U.S. et al., 1995). Dalším, nikoli však výhradním znakem epidemického kmene je tzv. *B. cepacia* epidemic strain marker, který je součástí ostrova patogenity označovaného jako *cci* (*cenocepacia* island) (Mahenthiralingam E. et al., 1997). Kromě těchto charakteristických markerů lze u J2315 i ostatních členů ET12 nalézt celou řadu dalších faktorů patogenicity (siderofory, hemolytické toxiny, proteázy a systém quorum sensing) (Mahenthiralingam E. et al., 2005).

Pomocí MLST analýz jednotlivých izolátů J2315, ale i dalších kmenů *B. cenocepacia* patřících do skupiny IIIA, bylo zjištěno, že i přes rozdílné profily získané pomocí molekulárně typizačních technik, které plynou z odlišností v genomickém uspořádání, se na sekvenční úrovni DNA jedná o klonální komplex s vysokou měrou příbuznosti (Baldwin A. et al., 2005). Bylo rovněž zjištěno, že konzervované sekvence genomu J2315 obsahují

pouze omezené množství polymorfizmů, a to navzdory odlišnostem ve fingerprintových profilech jednotlivých izolátů J2315 (Coenye T. a Vandamme P., 2006). Genetické příčiny vzniku těchto odlišností nejsou zcela objasněny. Z velké části lze však vznik těchto odlišností vysvětlit rekombinačními procesy mezi inzerčními sekvencemi (inzerce, inverze, delece atd.), které mají za následek přeskupování a změny v rámci téhož genomu (viz níže).

3.3.4. Epidemický kmen CZ1

Na základě vysoké prevalence infekce mezi českými pacienty byla na začátku tohoto století provedena studie, která odhalila, že původci většiny infekcí způsobených bakteriemi *Bcc* patří do druhu *B. cenocepacia* (Drevinek P. et al., 2005). Následná podrobná molekulárně typizační analýza prokázala, že v české populaci pacientů s CF cirkuluje epidemický kmen, který byl označen jako CZ1. Tento kmen je příbuzný s již dříve popsáním epidemickým kmenem ET12 (Drevinek P. et al., 2005). Pomocí MLST (viz níže) bylo poté zjištěno, že jde o sekvenční typ 32 (ST 32). Stejný ST epidemického kmene byl zjištěn u epidemického kmene označeného dříve jako RAPD 01, který byl identifikován mezi pacienty s CF v Kanadě i dalších zemích, např. v Itálii, Velké Británii nebo Francii (Drevinek P. a Mahenthiralingam E., 2010). Způsob, jakým se kmene s ST 32 šíří, není známý. Možným vysvětlením je jejich přenos z vnějšího prostředí, nebo možnost nákazy zdravotnickými pomůckami, či předměty používanými běžně pacienty s CF (Drevinek P. a Mahenthiralingam E., 2010). Možný přenos prostřednictvím zdravotnických pomůcek byl podpořen studií uveřejněnou Graindorgem a kolegy, kteří popsali rozšíření infekce kmenem s ST 32 mezi sedmi pacienty jednotky intenzivní péče, kteří byli napojeni na mechanickou ventilaci (Graindorge A. et al., 2010). Tato studie potvrzuje vysokou schopnost přenosu a rozšíření infekce i mimo populaci pacientů s CF (Drevinek P. a Mahenthiralingam E., 2010).

Přestože kmene ET12 (ST 28) a CZ1 (ST 32) jsou úzce příbuzné a oba náleží do podskupiny IIIA, jejich MLST profily se liší ve třech genových alelách (Drevinek P. a Mahenthiralingam E., 2010). Odlišné chování obou kmenů lze pozorovat i v podmínkách oxidativního stresu, kterému byly oba kmene experimentálně vystaveny a které simulovalo prostředí dýchacích cest u chronicky nemocných pacientů s CF (Drevinek P. a Mahenthiralingam E., 2010) (viz speciální část).

3.3.5. Genom komplexu *B. cepacia*

Bakterie *Bcc* mají velmi plastický genom netypický pro prokaryotní organizmy. Genom je rozdělen do tří cirkulárních chromozomů a jednoho plazmidu a jeho velikost se pohybuje v rozmezí 6–9 Mbp (Holden M.T. et al., 2009).

Kompletní sekvenace genomu J2315 byla dokončena v roce 2003 a ukázala, že bakteriální genom obsahuje překvapivě velké množství genomických ostrovů, které zaujímají více než 9 % z celkové velikosti chromozomu (Holden M.T. et al., 2009). Na základě tohoto zjištění se předpokládá, že genomické ostrovy jsou nositeli většiny faktorů virulence a mají tak klíčovou roli v adaptačních procesech kmene včetně schopnosti dlouhodobě osídlit respirační trakt pacientů s CF.

Jedním z těchto ostrovů je BcenGI11, dříve označovaný jako *B. cenocepacia* island (*cci*), který je přítomný u všech epidemických kmenů *B. cenocepacia* (Baldwin A. et al., 2005). BcenGI11 kóduje specifickou oblast, označovanou jako *B. cepacia* epidemic strain marker (BCESM), která se využívá jako ukazatel epidemického potenciálu kmene. Sekvenační analýzou bylo zjištěno, že v BcenGI11 je přítomna inzerční sekvence *ISBcen14*, jedna z 22 různých IS, které se vyskytují v genomu *B. cenocepacia* J2315. Sekvenční analýzou J2315 bylo zjištěno, že 4 z 22 IS, se vyskytují ve více než jedné kopii. Jde o *IS407* (13 kopií), *ISBcen8* (12 kopií), *ISBcen9* (9 kopií) a *ISBcen20* (9 kopií) (Holden M.T. et al., 2009).

IS jsou nejjednodušším typem transpozonu, který obsahuje pouze gen pro transpozázu a invertované repetice na svých koncích. IS, mají i přes svou jednoduchost, schopnost podporovat genomické přeskupování jako jsou delece, duplikace, rekombinace a inzercí do sekvence genu mohou ovlivnit jeho transkripční aktivitu (Wood M.S. et al., 1991; Miche L. et al., 2001). Předpokládá se, že asociace IS s určitými geny může způsobovat zvýšenou transmisibilitu a patogenicitu daného kmene *Bcc*. Zvláště zajímavé jsou aktivní IS, jejichž transpozice probíhá v blízkosti genů, které se podílejí na adaptaci bakterie v nejrůznějších stresových podmínkách prostředí a jejichž přítomnost umožňuje bakteriím využít potenciálně toxické látky jako zdroj uhlíku (Hubner A. a Hendrickson W., 1997). Některé studie navíc prokázaly, že přeskupování IS a tím i aktivaci určitých genů lze vyvolat v *in vitro* podmínkách a tím experimentálně simulovat prostředí dýchacích cest u pacientů s CF (Scordilis G.E. et al., 1987; Wood M.S. et al., 1991; Miche L. et al., 2001).

3.4. Metody detekce a typizace bakteriálních patogenů

Správná identifikace a typizace bakterií až na kmenovou či klonální úroveň je důležitá pro přesnou diagnostiku, nastavení vhodné léčby i ke zjištění epidemiologického obrazu bakteriální infekce zejména u těch bakteriálních druhů, které jsou vysoce odolné vůči antibiotické léčbě a podílejí se na vzniku nosokomiálních infekcí. Vhodná typizační metoda musí mít vysokou rozlišovací schopnost (*discriminatory power*), tj. schopnost odlišit nepříbuzné kmeny, dostatečnou reprodukovatelnost, tj. poskytnout při opakování tentýž výsledek na vnitrolaboratorní i mezilaboratorní úrovni a má být snadno implementovatelná do rutinního provozu a ekonomicky přijatelná (van Belkum A. et al., 2007). Metody identifikace a typizace se dělí na fenotypové a genotypové. Fenotypové metody popisují vlastnosti bakterií jako morfologie kolonií na nejrůznějších kultivačních médiích, výsledky serologických a biochemických testů, patogenita nebo citlivost na antibiotika (Li W. et al., 2009; Jackson G.W. et al., 2006). Vzhledem k časové náročnosti a nedostatečné rozlišovací schopnosti většiny těchto metod došlo v posledních desetiletích k velkému rozvoji metod genotypizačních, které mají oproti fenotypovým metodám řadu výhod včetně vyšší rozlišovací schopnosti a reprodukovatelnosti. Umožňují u každého izolátu určit genotypový profil (např. elektroforetický fingerprint nebo sekvenční typ), který umožňuje jeho identifikaci až na úroveň kmene či epidemického klonu.

Genotypizační metody lze rozdělit do tří kategorií. První kategorií tvoří metody založené na tvorbě fragmentů DNA. Zařazení do typů je provedeno na základě rozdílů ve velikosti DNA fragmentů, které vznikají amplifikací genomové nebo plazmidové DNA, štěpením DNA pomocí restrikčních enzymů, nebo kombinací obou technik. Identifikace jednotlivých fragmentů je prováděna na běžném agarózovém gelu nebo pomocí automatizovaných systémů kapilární elektroforézy. Do této skupiny patří makrorestrikční analýza DNA s následnou separací fragmentů v pulzním elektrickém poli (*Pulsed Field Gel Electrophoresis* – PFGE), která je považována za zlatý standard typizačních metod. Metoda je založena na štěpení genomové bakteriální DNA restrikčními endonukleázami, které rozeznávají malý počet míst na chromozomu a vytváří tak velké fragmenty DNA (30–800 kb), které nemohou být účinně odděleny konvenční elektroforézou. K separaci se využívá elektroforéza se střídáním směru elektrického pole. K vyhodnocování, především u bakteriálních populací způsobující časově omezené epidemie, lze využít tzv. Tenoverova kritéria. PFGE lze využít pro její rozlišovací schopnost a reprodukovatelnost pro typizaci řady běžných patogenů (Arbeit R.D. et al., 1990; Tsen H.Y. et al., 2002; Saulnier P. et al., 1993).

Hlavním omezením této metody je časová náročnost provedení (2–4 dny), poměrně nákladné technické vybavení a určitá míra subjektivity při vyhodnocování získaných profilů. PFGE byla využita k typizaci celé řady patogenů, např. *Klebsiella pneumoniae* (Vimont S. et al., 2008), *P. aeruginosa* (Grundmann H. et al., 1995) či *S. maltophilia* (Valdezate S. et al., 2004).

Další metodou založenou na tvorbě fragmentů DNA je metoda polymorfizmu délky restričních fragmentů (*Restriction Fragment Length Polymorphism* – RFLP). Vzhledem k tomu, že při této metodě jsou používány restriční endonukleázy generující vysoký počet fragmentů, často se pro analýzu využívá hybridizace pomocí DNA sond, jež snižují počet viditelných fragmentů. Jako příklad lze uvést využití sond odvozených od inzerční sekvence IS6110 používané jako zlatý standard pro typizaci bakterií *Mycobacterium tuberculosis* (Zacsek A. et al., 2013). Variantou RFLP je i ribotypizace, která je založena na analýze sekvencí rRNA operonu. Výsledkem je fingerprintový profil – ribotyp, který reflektuje četnost rRNA operonů v bakteriálním druhu. Ribotypizace byla využita např. při analýze *Listeria monocytogenes* (Matloob M. a Griffiths M., 2014) a *Vibrio cholerae* (Taneja N. et al., 2012).

Do této skupiny lze zařadit i metodu amplifikace polymorfních úseků DNA (*Random Amplified Polymorphic DNA assay* – RAPD), která je založena na amplifikaci polymorfních úseků DNA pomocí primeru – krátkého oligonukleotidu. Získané fragmenty jsou následně rozděleny elektroforeticky. Jde o rychlou metodu, jejíž hlavním úskalím je nízká reprodukovatelnost, neboť i drobné variace v reakčních podmínkách mohou výrazně ovlivnit výsledek. Proto je metoda vhodná především pro rychlou prvotní analýzu omezeného počtu vzorků, neboť srovnávání profilů získaných při nezávislých měření je nespolehlivé.

Dalšími metodami využívající amplifikaci DNA a následnou separaci vzniklých fragmentů pomocí elektroforézy jsou metody Rep-PCR (*Repetitive sequence – based Polymerase Chain Reaction*), BOX-PCR (*BOX Polymerase Chain Reaction*) a ERIC-PCR (*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus Polymerase Chain Reaction*), kdy jsou užity primery komplementární k opakujícím se úsekům bakteriální DNA, tzv. elementům REP, sekvencím BOX, nebo sekvencím ERIC. Využívají se k typizaci prokaryotních i eukaryotních organismů, mimo jiné i epidemiologicky významných bakterií *Acinetobacter* spp. (Versalovic J. et al., 1991), *M. tuberculosis* (Cangelosi G.A. et al., 2004), *Clostridium difficile* (Northey G. et al., 2005) aj.

Kombinací štěpení DNA restričními endonukleázami a selektivní amplifikací vybraných fragmentů využívá polymorfizmus délky amplifikovaných fragmentů (*Amplified*

Fragments Length Polymorphism – AFLP), který zahrnuje naštěpení genomové DNA dvěma restričními enzymy, ligací vzniklých fragmentů s koncově specifickými adaptéry a selektivní amplifikaci pomocí fluorescenčně značených primerů, které jsou komplementární ke koncovým adaptérům. Selektivní amplifikaci umožňuje dodatečný nukleotid umístěný na 3' konci primerů. Amplifikuje se tak přibližně pouze 1/16 restričních fragmentů a tyto amplikony jsou poté elektroforeticky rozděleny na polyakrylamidovém gelu. AFLP lze využít pro studium *P. aeruginosa* (Knoester M. et al., 2014), *Acinetobacter baumannii* (Nemec A. et al., 2008) a *Helicobacter pylori* (Cellini L. et al., 2006).

Druhou skupinu tvoří metody založené na sekvenaci DNA. Typizace je založena na porovnání primární struktury cílové DNA a jejích polymorfizmů u studovaných izolátů. Tyto metody můžeme dále dle principu rozdělit na tradiční Sangerovo sekvenování a sekvenování nové generace (*Next generation sequencing*). První ze zmíněných metod je označována jako dideoxysekvenace nebo enzymová sekvenace, která pořadí nukleotidů určuje pomocí detekce ukončení prodlužujícího se vlákna DNA. K tomuto ukončení vlákna DNA se využívá zařazení dideoxynukleotidu (ddNTP). Sekvenování nové generace je založeno například na detekci a kvantifikaci pyrofosfátu, který je uvolňován během inkorporace nukleotidu při syntéze DNA (Ronaghi M. et al., 1998). Sekvenování využívá jak kódující tak nekódující oblasti DNA. Výhodou sekvenování je bezesporu jeho reprodukovatelnost a možnost mezilaboratorního porovnání díky veřejně přístupným internetovým databázím. Metodou využívající sekvenování je i metoda multilokusové sekvenční typizace (*Multilocus sequence typing – MLST*), která představuje postup pro charakterizaci bakteriálních izolátů pomocí amplifikace a následné sekvenace několika, nejčastěji sedmi, provozních genů. MLST je vhodnou metodou pro provádění dlouhodobých studií zabývajících se strukturou bakteriálních populací. Zásadní předností MLST je jednoznačnost a plná portabilita dat a možnost jejich porovnání se sekvencemi uloženými ve veřejných on-line databázích (<http://www.mlst.net>; <http://www.pubmlst.org>). To umožňuje zařazení lokálních dat do širšího kontextu a epidemiologickou analýzu na globální úrovni (Feil E.J. a Spratt B.G., 2001; Maiden M.C. et al., 1998; Aanensen D.M. a Spratt B.G., 2005).

Poslední skupinu genotypizačních technik tvoří tzv. hybridizační metody, které využívají k vyhledávání mutací sondy – fluorescenčně značené úseky DNA o známé sekvenci, které jsou komplementární ke studovanému úseku DNA nebo RNA. Sonda může hybridizovat s velkým počtem DNA fragmentů, které jsou ve formě sestav – *array* uspořádané na nosiči – membráně (skleněné, plastové nebo křemíkové destičce, nebo na nejrůznějších kovových slitinách). Na základě velikosti a počtu DNA fragmentů na nosiči

můžeme tyto sestavy rozlišit na makro- a mikroarraye. Makroarraye obvykle jako nosič využívají nylonové membrány a obsahují až 5 000 nosných míst. Jsou využívány např. ke klasifikaci *S. aureus* (Trad S. et al., 2004) a *Corynebacterium diphtheriae* (Mokrousov I. et al., 2009). Naproti tomu mikroarraye jsou efektivním nástrojem pro zkoumání bakteriálních transkriptomů (DeRisi J. et al., 2000) a genetické diverzity (Garaizar J. et al., 2006). Na rozdíl od Southern blottingu a makroarrayí, které jsou limitovány počtem sond, nabízí mikroarraye až několik desítek tisíc sond uspořádaných přímo na jediném čipu.

3.5. Situace v pražském centru pro léčbu CF

Pražské centrum pro léčbu CF při 2. LF UK v Praze a FN v Motole je největším centrem pro pacienty s tímto onemocněním v ČR.

3.5.1. Diagnostika komplexu *B. cepacia*

Kultivační diagnostika bakterií *Bcc* založená na využití selektivního agaru BCSA (*Burkholderia cepacia selective agar*) byla zavedena v tomto centru v roce 1994. Již první výsledky signalizovaly závažný problém. Bylo zjištěno, že bakterie, v té době označovaná ještě jako *Pseudomonas cepacia*, je přítomna zhruba u 20 % všech pacientů s CF. Do roku 2001 bylo možné potvrdit přítomnost *Bcc* pouze kultivačními technikami, které byly značně složité a zdlouhavé pro pomalý růst bakterií a zároveň neumožňovaly druhové rozřazení izolátů. V tomto roce bylo dosaženo výrazného pokroku v diagnostice implementací molekulárně genetické diagnostiky z klinického materiálu založené na polymerázové řetězové reakci (*Polymerase chain reaction* – PCR) amplifikující gen *recA*. Jde o tzv. nested PCR, při kterém se využívají dva páry primerů – vnitřní a vnější. V prvním kole se v případě *Bcc* využívá dvojice vnějších primerů amplifikující část genu *recA* o délce 1043 bp. V případě, že tato část není detekována, použije se produkt z prvního kola jako templát v druhém kole PCR s vnitřními primery, jež amplifikují oblast o délce 620 bp.

Využití molekulárně genetických metod umožnilo citlivou a přesnou diagnostiku, jež oproti kultivačním postupům umožňuje záchyt patogenu v klinickém materiálu rychleji a už při výrazně nižší koncentraci. Kromě přímé detekce bakterií *Bcc* byly zavedeny i specifické PCR reakce, které umožňují následnou identifikaci genomovarů I až VIII. S narůstajícím počtem druhů *Bcc* a zavedením metody MLST do rutinního provozu však pozbyly tyto druhově specifické PCR významu (viz dále).

Aplikací nested PCR a druhově specifických PCR reakcí byl potvrzen dominantní výskyt genotypu *B. cenocepacia* subtyp IIIA (Drevinek P. et al., 2002). Následující

molekulárně – epidemiologická typizace prokázala převládající výskyt epidemického kmene CZ1 (Drevínek P. et al., 2005). Toto zjištění vedlo ke zpřísnění a důslednému dodržování segregčních a protiepidemických opatření. V klinické praxi to znamenalo nejen dodržování přísného hygienicko–epidemiologického režimu, ale i zabránění kontaktu mezi nekolonizovanými a infikovanými pacienty i mezi těmi, kteří jsou infikováni odlišnými kmeny *Bcc*.

3.5.2. Diagnostika *P. aeruginosa*

Podobně jako v ostatních centrech pro CF je za vysoké procento infekcí pacientů v pražském centru zodpovědná *P. aeruginosa*. Diagnostický průkaz tohoto patogenu je stále postaven na jeho amplifikaci za využití klasických kultivačních půd. Na přelomu let 2003 a 2004 byl kultivační průkaz doplněn o přímou molekulárně–genetickou detekci patogenu v klinickém materiálu, jež je založena na nested PCR zaměřené na gen pro lipoprotein vnější membrány – *oprL*. Tato metoda však neposkytovala spolehlivé výsledky a základem diagnostiky tedy i nadále zůstalo pravidelné kultivační vyšetření. V současné době se pro molekulární diagnostiku využívá real–time PCR. I přes vysoký výskyt infekce *P. aeruginosa* mezi českými pacienty s CF, doposud chyběla podrobná epidemiologická analýza zaměřená na genetickou strukturu a vlastnosti této bakteriální populace.

4. CÍLE

- Prvním cílem bylo rozhodnout, zda se na infekcích pacientů pražského centra pro léčbu cystické fibrózy podílejí epidemické kmeny *P. aeruginosa* či nikoliv. K detailnímu mikrobiologicko–epidemiologickému šetření měly být využity celogenomové genotypizační techniky s vysokou rozlišovací účinností.
- Druhým cílem bylo identifikovat bakteriální izoláty *Bcc*, získané z klinického materiálu pacientů s CF, metodou multilokusové sekvenční typizace (MLST) až na úroveň kmene bez nutnosti kultivačního záchytu.
- Posledním cílem bylo studium genomů kmenů *Bcc* CZ1, ET12, RAPD 04 a RAPD 06 s ohledem na inzerční sekvence (IS), které mohou být příčinou odlišných makrorestrikčních profilů genomové DNA u izolátů se shodným ST profilem. Řešení tohoto cíle mělo zahrnovat aplikaci vybraných stresových podmínek za účelem prokázání přeskupování IS v genomu CZ1–1238 a ET12–J2315 a detekci možného přemísťování *ISBcen20* mechanismem „cut and paste“ v genomu vybraného izolátu ET12 metodou multiplex–PCR.

5. MATERIÁLY A METODY

5.1. Studium vlastností a klonálních vazeb izolátů *P. aeruginosa* získaných od pacientů pražského centra pro léčbu CF

5.1.1. Identifikace izolátů *P. aeruginosa*, extrakce DNA a vyšetření citlivosti na antimikrobní látky

Extrakce bakteriální DNA byla provedena s využitím extrakčního činidla CHELEX resin 100 (Bio-Rad, USA). Druhová identifikace všech 69 izolátů *P. aeruginosa* byla provedena pomocí API20NE systému (BioMerieux, Francie), která byla následně potvrzena pomocí PCR zaměřené na oblast *oprL* genu (De Vos D. et al., 1997). Minimální inhibiční koncentrace antimikrobiálních látek byly vyšetřeny mikrodiluční metodou podle pokynů CLSI ([www.http://clsi.org](http://clsi.org)). Testované antimikrobní látky byly: amikacin, cefepim, ceftazidim, ciprofloxacin, gentamicin, kolistin, meropenem, netilmicin, piperacilin a tobramycin.

5.1.2. Analýza genetické diverzity

Pro stanovení klonální vazby mezi jednotlivými izoláty *P. aeruginosa* byly zvoleny dvě fingerprintové metody, a to AFLP a PFGE.

Polymorfismus délky amplifikovaných fragmentů – AFLP

Restrikční štěpení a ligace purifikovaných DNA byla provedena v 10 µl reakční směsi, která obsahovala 50 ng templátové DNA, 1 U *EcoRI* (Amersham Pharmacia Biotech), 1 U *MseI* (New England BioLabs, USA), 4 U T4 DNA ligázy (Amersham Pharmacia), 1x T4 DNA ligační pufr, 500 ng BSA, 50 mM NaCl, 2 pmol adapteru *EcoRI* a 20 pmol adapteru *MseI*. Po inkubaci byla směs naředěna 10 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA (pH 8,0) do celkového objemu 200 µl. 5 µl takto naředěné směsi bylo přidáno do objemu 10 µl reakční směsi obsahující 20 ng primeru *EcoRI* značeného pomocí Cy5 (Cy5'-GACTGCGTACCAATTC 3'), 60 ng *MseI*+C (5' GATGAGTCCTGAGTAAc 3', kde c je selektivní c báze), 1x Taq polymerázového pufru, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM každého dNTP a 1 U polymerázy Goldstar Taq. Amplifikace byla provedena za následujících podmínek: 2 min při 72 °C, 2 min při 94 °C, poté následoval jeden cyklus sestávající se z 30 s při 94 °C, 30 s při 65 °C a 60 s při 72 °C. Amplifikace pokračovala dalšími 12 cykly s následujícím

nastavením: 30 s při 94 °C, 30 s při teplotě 0 ± 7 °C nižší než byla teplota v předešlém cyklu, kdy počáteční teplota v prvním cyklu byla 64,3 °C a závěrečná syntéza 60 s při 72 °C. Následovalo dalších 23 cyklů: 30 s při 94 °C, 30 s při 56 °C, 60 s při 72 °C. Závěrečný cyklus se skládal z 10 min při 72 °C. PCR produkty byly smíseny s 3 μ l formamidu obsahujícího 0 ± 5 % dextranové modři a následně inkubovány 5 min při teplotě 95 °C a zchlazeny v ledové lázni. Separace fragmentů byla provedena na vysokorozlišovacím polyakrylamidovém gelu (Amersham Pharmacia Biotech) pomocí automatizovaného systému ALF express. Elektroforetogramy tvořené fragmenty v rozmezí velikostí 50–500 bp byly analyzovány softwarem Bionumerics 4.6 (Applied Maths, Belgie). Kritériem podobnosti profilů AFLP byl Pearsonův korelační koeficient. Konstrukce dendrogramu byla provedena shlukovou metodou Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean – UPGMA.

Makrorestrikční analýza s následnou separací v pulzním elektrickém poli – PFGE

Klonální příbuznost jednotlivých izolátů byla zároveň stanovena pomocí štěpení bakteriální DNA restrikční endonukleázou *SpeI* a následným separováním vzniklých fragmentů v pulzním elektrickém poli.

Vzorky byly naočkovány ze zamražené kultury nebo čerstvého vzorku na plotny s trypton–sojovým agarem (TSA; Sigma – Aldrich, Německo) a inkubovány při 37 °C po dobu 24 h. Poté byly přeočkovány a subkultivovány v TSB při 30 °C po dobu dalších 24 h. 500 μ l narostlé bujónové kultury bylo centrifugováno 2 min při 4000 rpm. Po odlití supernatantu byla peleta resuspendována v 500 μ l promývacího roztoku (1 M TRIS s 6% roztokem NaCl); promytí bylo opakováno celkem 4x. Poté byla provedena adjustace buněčné suspenze při vlnové délce 600 nm na optickou denzitu (OD) 1,0. 200 μ l standardizované suspenze bylo smícháno s 200 μ l 2% agarózy (Agarose Type VII, Sigma, USA), vytemperované na 45 °C, směs byla přenesena do speciálních formiček pro přípravu disků a ponechána cca 10 min ztuhnout v chladničce. Ze vzniklých disků byl uříznut malý proužek, který byl lyzován 5 h při teplotě 37 °C v 1 ml roztoku obsahujícího 1 M Tris (pH 8,0), 1 M NaCl, 0,5 M EDTA, 0,2% deoxycholát sodný (Sigma), 0,5% N–lauroyl sarkosinu sodného (Sigma) a 1 mg lysozymu (Sigma). Následně byla provedena lýze v 1 ml roztoku složeného z 0,5 M EDTA, 1 % N–lauroyl sarkosinu a 1 mg proteinázy K (Sigma,) při 65 °C přes noc. Po zlyzování byly jednotlivé disky pětkrát promyty v roztoku Tris (pH 8,0), 0,5 M EDTA za stálého třepání po dobu 30 min. Bakteriální DNA zalitá do agarózových disků byla naštěpena pomocí restrikčního enzymu *SpeI* (30U/disk; New England Biolabs, UK) při teplotě 37 °C po dobu 24 h. Separace fragmentů probíhala na 1,2% gelu SeaKem LE

agarózy (Calbrex, USA) v 0,5 x Tris–borát EDTA pufru (TBE). Nejprve bylo připraveno 2,1 litru 0,5 x TBE. Z tohoto množství bylo 100 ml použito na rozpuštění 1,2 g agarózy. Hotová agaróza byla ponechána ve vodní lázni při 50 °C. Naštěpené disky byly vyjmuty ze směsi s restriční endonukleázou a opatrně osušeny savým materiálem. Pak pomocí kličky a krycího sklíčka byly položeny na hřeben elektroforézy a ponechány cca 10 min. Do první a poslední pozice hřebenu byl umístěn velikostní marker. Poté byl hřeben položen na formu gelu a zalit temperovanou agarózou. Jamky vzniklé po vyjmutí hřebenu byly zality uchovaným zbytkem agarózy. Gel byl po dokonalém zatuhnutí (cca 30 min) vyjmut z formy a vložen do elektroforetické vany. Vzniklé fragmenty byly separovány pomocí přístroje CHEF–DRIII (BioRad, USA) při 14°C po dobu 20 h. Separační podmínky PFGE byly následující: Switch time: 5–35 s, doba separace 20 h, voltáž 6 V/cm a úhel 120°.

Po separaci byl gel barven v roztoku TBE s přidavkem 1 µl ethidium bromidu (výsledná koncentrace ethidium bromidu byla 1 µl/ml) po dobu 20 min a oplachován cca 5 min ve vodě. Dokumentace výsledků byla prováděna pomocí digitálního fotografického přístroje. Velikost jednotlivých pruhů v profilu každého izolátu byla adjustována podle velikostního markeru, který byl separován na gelu společně se vzorky. Profily jednotlivých izolátů byly vzájemně porovnány vizuálně.

5.2. Identifikace a typizace bakterií komplexu *B. cepacia* pomocí MLST z klinického materiálu pacientů s CF bez nutnosti kultivační positivity

5.2.1. MLST

Bakteriální DNA byla ze sputa izolována pomocí kitu Amplicor Respiratory Specimen Extraction kit (Roche, USA). Celý postup se skládal z nested PCR reakce, přečištění PCR produktů, následné sekvenační reakce, opětovného přečištění a vlastní separace na kapilární elektroforéze. Reakční směs pro první kolo PCR o objemu 20 µl obsahovala: 2,0 mM MgCl₂ (Qiagen, Německo), 0,2 mM každého dNTP (Qiagen), 10 pmol amplifikačního primeru pro každou alelu (BioTech, Česká republika), 1x Q – solution (Qiagen), 0,75 U Taq polymeráza (Qiagen) a 1 µl vyzolované bakteriální DNA. Amplifikace byla provedena na termocycleru TGradient termocycler (Biometra, Německo) za následujících podmínek: počáteční denaturace 5 min při 96 °C, následně 30 cyklů: 30 s při 96 °C, 30 s při 55 °C a 2 min při 72 °C. Interní fragmenty DNA byly amplifikovány v druhém kole PCR, při kterém byly

použity stejné chemikálie jako v kole prvním, kromě amplifikačních primerů. Jako templát byl použit 1 μ l PCR produktu z prvního kola. Amplifikační profil druhého kola PCR byl nastaven takto: počáteční denaturace 5 min při 96 °C, následovaná 35 cykly skládajícími se z 15 s při 96 °C, 30 s při 60 °C, kdy v každém následujícím cyklu byla teplota snížena o 0,5 °C až na konečnou teplotu 55 °C, která byla zachována po zbývajícím počtu cyklů, 45 s při 72 °C a 10 min při 72 °C.

Získané PCR produkty byly přečištěny pomocí Agencourt Ampure robotem Biomek 3000 (obojí Beckman Coulter, USA). Následovala sekvenační reakce, která byla provedena pomocí BigDye Terminator 3.1 (Life Technologies, USA). Reakční směs o objemu 10 μ l a obsahovala 0,625 μ M sekvenační primeru, 1x sekvenační pufr, sekvenační směs BigDye Terminator 3.1 a 2 μ l přečištěného PCR produktu. Sekvenační program byl následující: 1 min při 96 °C, 25 cyklů: 10 s při 96 °C, 5 s při 55 °C, 4 min při 60 °C a závěrečná syntéza 7 min při 72 °C. Poté byla sekvenační reakce přečištěna robotem Biomek 3000 pomocí Agencourt CleanSeq (Beckman Coulter) a sekvenační produkty byly separovány v genetickém analyzátoru abi 3130xl (Applied Biosystems, USA). Výsledné sekvence byly analyzovány pomocí programů PreGap4 a Gap4 (Staden Package, UK).

5.3. Studium inzerčních sekvencí u *B. cenocepacia* a vliv stresových podmínek na jejich přeskupování

5.3.1. RFLP a Southern hybridizace

Pro analýzu byla využita genomická DNA získaná extrakcí pomocí skleněných kuliček (Mahenthiralingam E. et al., 1996). Přibližně 1,5 μ g bakteriální DNA bylo štěpeno pomocí enzymu *EcoRI* (80U/vzorek; Promega, USA) po dobu 4 h. Naštěpená DNA byla separována na 1% agarózovém gelu po dobu 15 h při napětí 0,8 V/cm a následně přenesena na nylonovou membránu.

Digoxigeninem značené hybridizační sondy specifické k jednotlivým IS – *ISBcen20*, *ISBcen8*, *ISBcen9* a *IS407* byly amplifikovány pomocí primerů uvedených v tabulce 2. Reakční směs byla připravena v objemu 25 μ l a obsahovala 1x PCR značený mix (Roche Applied Science, USA), 1x PCR pufr (Promega, USA), 1,5 μ M $MgCl_2$, 1,5 μ M každého dNTP a 1U Taq polymerázy. Amplifikační podmínky byly shodné s podmínkami pro multiplex PCR. Hybridizace a detekce výsledných profilů byla prováděna dle doporučení výrobce Roche Applied Science (USA). Do každé reakce byla přidána hybridizační sonda

v koncentraci 20 ng/ml a hybridizace probíhala při 50 °C přes noc. Analýza vzájemné podobnosti jednotlivých profilů provedena pomocí programu GelCompare II Software (Applied Maths).

Tabulka 2. Primery využité při RFLP

Hledaná IS	Typ primeru	Sekvence (5' - 3')	Velikost produktu (bp)
<i>ISBcen20</i>	Forward	TGATCGAGCCGTTATTGC	736
	Reverse	GCAGCAACCGAGTTTGAG	
<i>ISBcen8</i>	Forward	GACGTCGCAAAAGCTCAC	842
	Reverse	GCGACCTTGGACAGTTTG	
<i>ISBcen9</i>	Forward	CGCAATGCCAAAACACC	953
	Reverse	TTGATGCGCTCCGTGATTG	
<i>IS407</i>	Forward	GGTTCAGTGATGCGTCGT	1 016
	Reverse	GGAAAGCGGCAGGAGTAT	

5.3.2. Vystavení bakteriálních izolátů účinkům sériového pasážování

Pro posouzení stability *ISBcen20* během růstu byl izolát kmene CZ1 nejprve naočkován do LB média a kultivován při 37 °C přes noc. Poté byly bakterie vysety na agar LB a opět kultivovány přes noc. Z narostlé kultury byly jednotlivé kolonie zaočkovány do LB média a kultivovány při 37 °C přes noc. Cyklus byl opakován minimálně osmkrát pro získání derivátů kmene CZ1. Získané kolonie byly po proběhnutí cyklu napěstovány a zamrazeny v kultivačním médiu s přídavkem dimethylsulfoxidu (DMSO).

5.3.3. Expozice bakteriálních izolátů účinkům peroxidu vodíku

Studium vlivu oxidativního stresu na plasticitu genomu bylo provedeno na izolátech kmenů CZ1 a J2315. Tyto izoláty byly pěstovány v LB médiu při 37 °C za stálého třepání do denzity 5×10^8 buněk. Poté byly sklizeny a centrifugovány při 1500 x g po dobu 5 min. Peleta byla resuspendována v 3 ml bazálního solného média obsahujícího 22 mM glukózy, 0,05 % kasaminokyseliny a subinhibiční koncentraci peroxidu vodíku (v případě CZ1 0,01%, u J2315 0,1%). Inkubace bakteriální kultury byla provedena do nárůstu OD 0,6 (měřeno při vlnové délce 600 nm). Narostlé kultury byly sériově naředěny a vysety na TSA. V případě kmene CZ1 bylo pro další studium vybráno a kultivováno celkem sedm kolonií, které byly následně napěstovány a zamrazeny v kultivačním médiu s přídavkem DMSO. U kmene J2315 byly jednotlivé kolonie přeočkovány do 96-jamkové desky obsahující 150 μ l LB média, kultivovány při 37 °C přes noc a zamrazeny v kultivačním médiu s přídavkem DMSO.

5.3.4. Vystavení bakteriálních izolátů podmínkám teplotního šoku

Studium vlivu teplotního šoku na stabilitu IS v bakteriálním genomu kmene CZ1 bylo provedeno tak, že přes noc narostlé bakteriální kultury byly ponechány ve vodní lázni při teplotě 42 °C po dobu 30 min. Následně byly kultury sériově naředěny a vysety na TSA. Po kultivaci přes noc při 37 °C bylo vybráno sedm individuálních kolonií, které byly napěstovány a zamrazeny v kultivačním médiu s přídavkem DMSO.

5.3.5. Makrorestrikční analýza s následnou separací v pulzním elektrickém poli – PFGE

Metoda PFGE byla provedena dle dříve publikovaného protokolu (Drevinek P. et al., 2005). Celogenomová DNA zalitá do 2 % agarózy s nízkou teplotou tání, byla přes noc při teplotě 37 °C štěpena pomocí endonukleázy *SpeI* (3U/vzorek). Poté byly jednotlivé fragmenty separovány na 1,2% gelu v pulzním elektrickém poli po dobu 24 h. Separační podmínky byly nastaveny na napětí 6 V/cm a switch time 1–40 s po dobu 10 h a 30–90 s po dobu 14 h. Výsledné restrikční profily byly porovnány pomocí softwaru GelCompare II.

5.3.6. Detekce *ISBcen20* u kmene J2315

Detekce všech devíti kopií *ISBcen20* v genomu J2315 byla provedena pomocí univerzálního forward primeru v kombinaci s jedním z reverzních primerů, které byly specifické pro jednotlivé IS (tab. 3). Primery byly navrženy pro možnou detekci IS pomocí multiplex PCR. Detekce všech devíti IS byla rozdělena do tří multiplex PCR, kdy v první PCR reakci byla detekována inzerční místa IS 1, 4 a 7 v druhé inzerční místa IS 2, 5 a 8 a ve třetí reakci zbývající místa pro IS 3, 6 a 9. DNA byla izolována pomocí 5% chelexu (BioRad). Reakční směs pro všech devět IS byla připravena v objemu 20 µl s využitím reagensů kitu Taq core (Qiagen) obsahující 1x PCR pufr, 1x Q roztok, 3,7 mM MgCl₂, 0,2 mM každého dNTP, 0,75 U Taq polymerázy a forward a reverse primery v koncentraci uvedené v tab. 3. Amplifikace byla provedena na termocycleru Dyad DNA engine thermal cyclers (BioRad) s následujícím nastavením programu: 5 min při 94 °C, 30 cyklů: 30 s při 94 °C, 30 s při 60 °C, 45 s při 72 °C, závěrečná syntéza 5 min při 72 °C. Separace amplikonů byla provedena na 2% agarózovém gelu v TBE.

Tabulka 3. Přehled primerů použitých při multiplex PCR

Varianta ISBcen20	Sekvence (5' - 3')	Velikost amplikonu (bp)	Koncentrace primeru (μM)	Číslo multiplex reakce
1 (BCAL0573)	AGGAAATCGCCGCGATTC	322	1	M1
2 (BCAL1125)	TCTCGAACTGGAAGTGCC	387	0,75	M2
3 (BCAL1133)	TCCGACGAAAGGGTGACAC	491	0.4	M3
4 (BCAL2480b)	TCGAACCGGAACTTCTCC	557	1	M1
5 (BCAL2496)	CAGACTGGGTTGATCGAG	639	1,5	M2
6 (BCAL3126b)	TCTCCTTGTCGAGTCGAC	725	1.25	M3
7 (BCAL3484)	TTCGATCCTGCGTTCGAC	821	1	M1
8 (BCAM1906)	TGCAGAAGCAAGGGCATC	896	1,5	M2
9 (BCAM1925)	TCAGTTGTTCCGATGCCTG	944	1,75	M3
Forward primer	TCAGTTGTTCCGATGCCTG			

6. VÝSLEDKY

6.1. Studium vlastností a klonálních vazeb izolátů *P. aeruginosa* získaných od pacientů pražského centra pro léčbu CF

Poté, co byl mezi pacienty pražského centra pro CF zjištěn epidemický kmen *B.cenocepacia* CZ1 (Drevinek P. et al., 2005), jsme se zaměřili na epidemiologii infekcí vyvolaných *P. aeruginosa*. Přestože prevalence těchto infekcí mezi pacienty centra dosahovala téměř 40 %, nebyla doposud provedena detailní mikrobiologicko-epidemiologická analýza zaměřená na tento patogen a nebylo tudíž jasné, zda se při šíření infekce uplatňují epidemické kmeny, či zda jde o infekce vyvolané sporadickými kmeny. Proto jsme se rozhodli provést detailní genotypizaci izolátů získaných od těchto pacientů, a to za využití vysoce citlivých fingerprintových metod AFLP a PFGE. U všech izolátů byla též vyšetřena citlivost na protipseudomonádová antibiotika.

6.1.1. Vzorky pacientů s CF infikovaných *P. aeruginosa*

Do studie bylo zařazeno 225 z celkem 264 pacientů sledovaných v pražském centru pro CF. Těchto 225 pacientů představovalo 52 % všech potvrzených nemocných s CF v České republice. Věk pacientů začleněných do studie se pohyboval v rozmezí 8 až 22 let. Do studovaného souboru nebyli zařazeni pacienti, kteří nevykašlávali sputum, nenavštěvovali centrum pravidelně po dobu delší než jeden rok nebo nespolupracovali. Vzorky sput od 86 pacientů (38 % z celkových 270 pacientů) byly na přítomnost *P. aeruginosa* jednoznačně pozitivní. Celkem byly analyzovány vzorky sput od 69 pacientů představující většinu (80 %) pacientů kolonizovaných *P. aeruginosa*, kteří byli v dané době léčeni v pražském centru. Od každého z těchto 69 pacientů byl odebrán jeden vzorek sputa. Dále pak byl od 19 náhodně vybraných pacientů odebrán i druhý vzorek sputa. Časové rozmezí mezi odběry materiálu se pohybovalo mezi dvěma a sedmi měsíci.

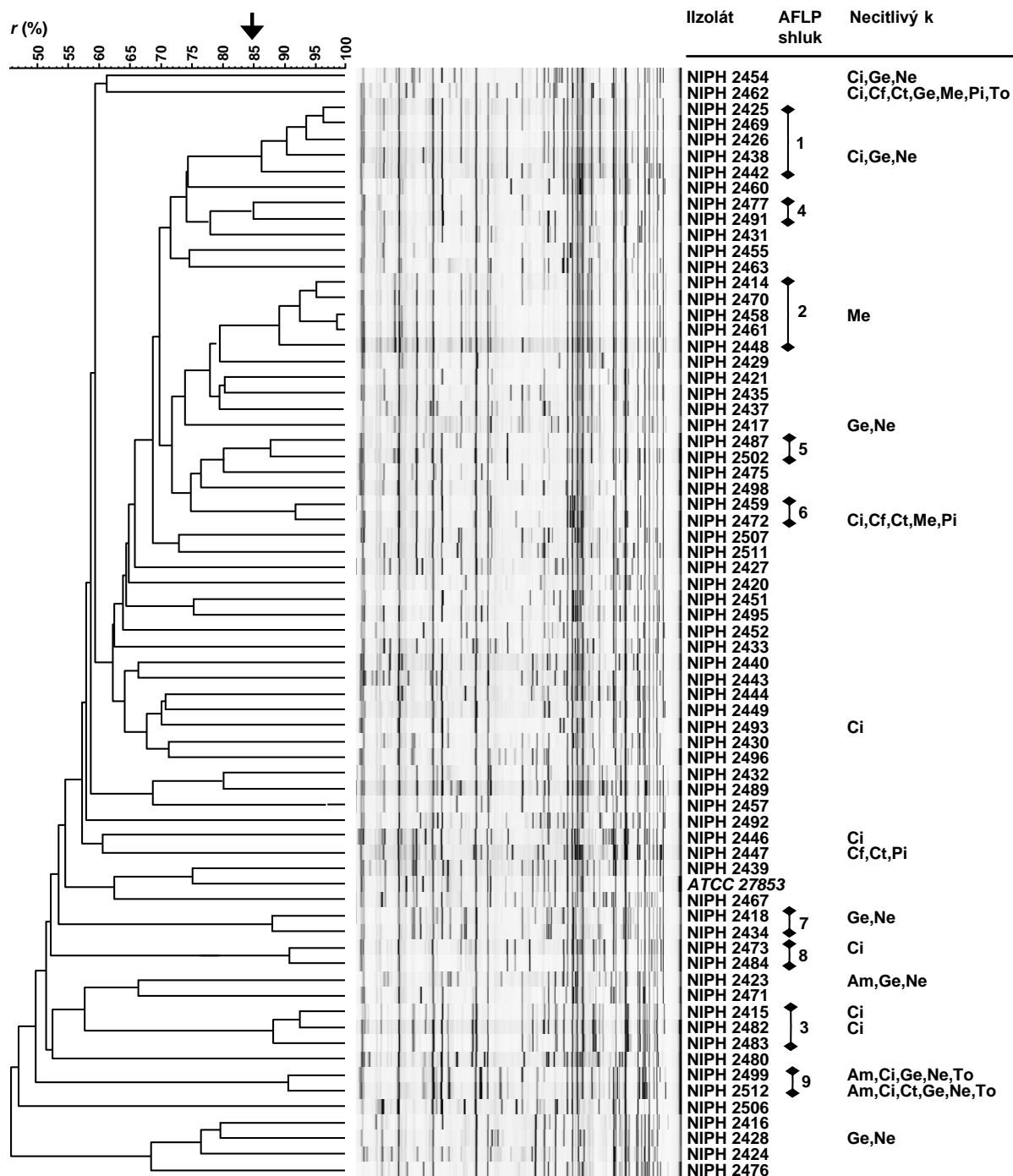
6.1.2. AFLP

Příbuznost jednotlivých izolátů byla nejprve posouzena pomocí metody AFLP (viz 5.1.2.). V prvním kroku byla definována hladina podobnosti, na níž lze spolehlivě odlišit genotypově rozdílné a tudíž epidemiologicky nesouvisející izoláty. K tomu jsme použili soubor zahrnující subkultury téhož kmene a několik skupin (izogenních) izolátů získaných vždy od téhož pacienta. Na základě těchto měření byla tato hranice stanovena na 85 % (izoláty s touto a nižší podobností profilů AFLP jsou genotypově a epidemiologicky odlišné).

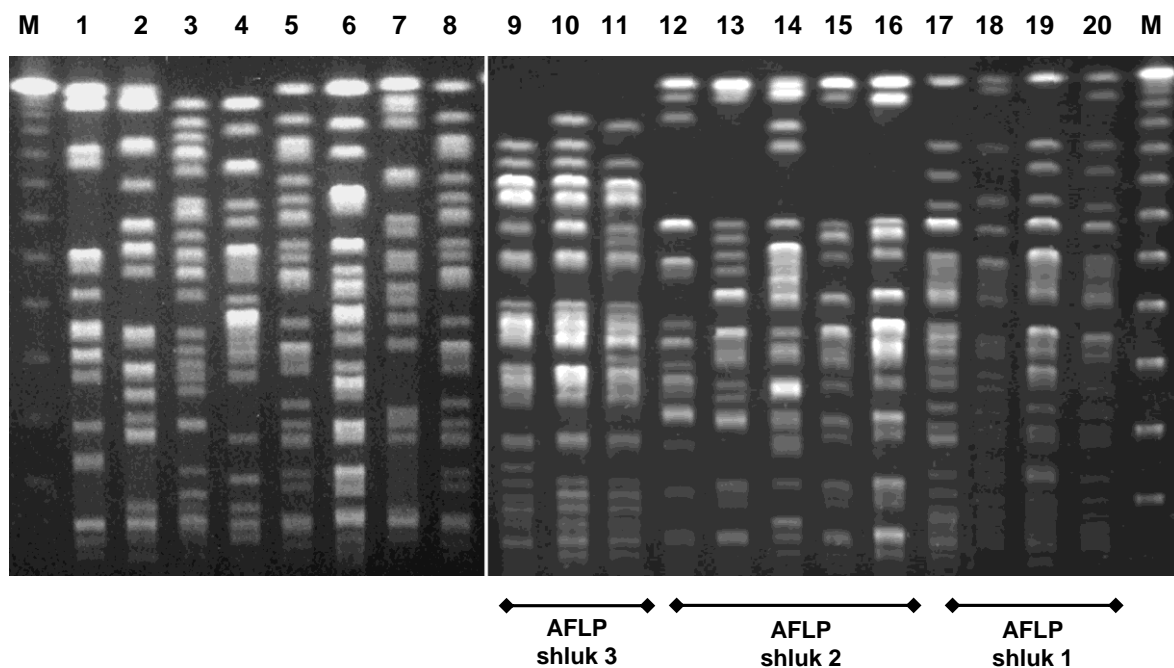
Obr. 1 ukazuje výsledek shlukové analýzy profilů AFLP 69 studovaných izolátů. Na zvolené hladině podobnosti bylo rozlišeno 44 izolátů s unikátním profilem a devět shluků označených 1–9. Shluky 1 a 2 obsahovaly po pěti izolátech, shluk 3 tři izoláty, zatímco každý ze zbývajících šesti shluků zahrnoval po dvou izolátech. Vysoká rozmanitost genotypů AFLP zůstala zachována i při relaxaci kritéria pro rozlišení nepříbuzných kmenů. Po snížení mezní podobnosti na 80 % byl analyzovaný soubor rozčleněn na 39 unikátních izolátů a 12 shluků obsahujících po dvou až pěti izolátech. To znamená, že více než polovina pacientů ze studovaného souboru byla infikována jedinečným kmenem, zatímco proporce pacientů s klonálně příbuznými izoláty (představujícími pravděpodobně tentýž kmen) dosáhla maximálně 7 % (pět izolátů ve shluku 1 nebo 2).

6.1.3. Makrorestrikční analýza s následnou separací v pulzním elektrickém poli

Celkem 64 z 69 izolátů *P. aeruginosa* studovaných AFLP bylo analyzováno též pomocí makrorestrikční analýzy (viz 5.1.2.) Pět izolátů nebylo z technických důvodů do této analýzy zařazeno (vesměs z důvodu opakovaně nečitelných fingerprintů). Výsledky makrorestrikční analýzy ilustrované na obr. 2 potvrdily vysokou genotypovou rozmanitost izolátů. Většina profilů se navzájem lišila ve více než šesti prouzcích, což při aplikaci kritérií podle Tenovera F.C. et al. (1995) vylučuje bezprostřední epidemiologickou vazbu. Oproti tomu izoláty, které tvořily shluk podle AFLP, měly i vzájemně shodné nebo velmi podobné profily. Vzhledem k publikovaným pracím popisujícím koinfekci pacienta několika odlišnými kmeny *P. aeruginosa* (Van Daele S.G. et al., 2005; Van Daele S. et al., 2006) byla provedena makrorestrikční analýza u dalších izolátů získaných od 19 pacientů náhodně vybraných z 64 osob, jejichž izoláty byly vyšetřeny dříve. Časový rozestup mezi odběrem prvního a druhého vzorku byl dva až sedm měsíců. U 15 pacientů měly první a druhý izolát shodný nebo velmi podobný profil. Ve zbývajících čtyřech případech byly nalezeny zcela odlišné profily. Profily těchto izolátů se nepodobaly navzájem, ani neodpovídaly žádnému z výše zmíněných shluků genotypově podobných izolátů. I když není jasné, zda heterogenita mezi izoláty téhož pacienta odráží perzistentní koinfekci dvěma kmeny nebo náhradu jednoho kmene jiným, toto zjištění dále svědčí o vysoké heterogenitě studované populace *P. aeruginosa* a nezávislém původu kmenů infikujících pacienty s CF.



Obrazek 1. Dendrogram profilů AFLP 69 izolátů *P. aeruginosa* od českých pacientů s CF. Shluky jsou definovány na 85% hladině podobnosti. Jako referenční kmen *P. aeruginosa* byl použit kmen ATCC 27853. Zkratky: Am, amikacin; Ci, ciprofloxacin; Cf, cefepim; Ct, ceftazidim; Ge, gentamicin; Me, meropenem; Ne, netilmicin; Pi, piperacilin; To, tobramycin.



Ob

Obrázek 2. Makrorestrikční profily získané štěpením genomové DNA izolátů *P. aeruginosa* pomocí *SpeI*. V pozici 2 až 8 jsou zobrazeny izoláty, které dle AFLP nejsou geneticky příbuzné, zatímco sloupce 9 až 20 představují izoláty, které spadají do tří odlišných AFLP shluků. Pořadí jednotlivých vzorků: 1, NIPH 2498; 2 – NIPH 2420, 3 – NIPH 2440, 4 – NIPH 2493, 5 – NIPH 2492, 6 – NIPH 2439, 7 – NIPH 2428, 8 – NIPH 2423, 9 – NIPH 2483, 10 – NIPH 2482, 11 – NIPH 2415, 12 – NIPH 2448, 13 – NIPH 2461, 14 – NIPH 2458, 15 – NIPH 2470, 16 – NIPH 2414, 17 – NIPH 2442, 18 – NIPH; 2426, 19 – NIPH 2469, 20 – NIPH 2425; M, velikostní marker Lambda (48.5 kb konkatemer).

6.1.4. Vyšetření antibiotické citlivosti *P. aeruginosa*

Citlivost 69 studovaných izolátů na protipseudomonádová antibiotika (viz 5.1.2.) shrnuje obr. 1 a tab. 4. Výsledky ukázaly neočekávaně nízký výskyt rezistence k antimikrobním látkám, jež jsou primárně účinné na *P. aeruginosa*. Tři čtvrtiny izolátů byly plně citlivé. Nejčastěji se vyskytla rezistence k ciprofloxacinu (11 izolátů) a ke gentamicinu (10 izolátů, z nichž devět bylo současně rezistentních k netilmicinu). Jenom šest izolátů bylo multirezistentních, tj. rezistentních k látkám reprezentujících minimálně dvě chemicky odlišné skupiny antibiotik (např. aminoglykozidy a chinolony nebo beta-laktamy) a pouhé dva izoláty byly rezistentní k zástupcům tří skupin. Žádný kmen nebyl rezistentní ke colistinu, který je v současnosti nejúčinnější klinicky použitelnou látkou v léčbě infekcí vyvolaných multirezistentními kmeny *P. aeruginosa*. Jak ukazuje obr. 1, shluky definované AFLP vesměs zahrnují plně citlivé izoláty. Pokud se ve shluku objevila rezistence, nikdy nebyla kvalitativně shodná u všech izolátů. Jde o další potvrzení kmenové heterogenity studované bakteriální populace.

Tabulka 4. Citlivost 69 izolátů *P. aeruginosa* na antibiotika

Antibiotikum	Proporce citlivých kmenů
Amikacin	96 %
Cefepim	96 %
Ceftazidim	94 %
Ciprofloxacin	84 %
Colistin	100 %
Gentamicin	86 %
Meropenem	96 %
Netilmicin	87 %
Piperacilin	96 %
Tobramycin	96 %

6.2. Identifikace a typizace bakterií komplexu *B. cepacia* pomocí MLST z klinického materiálu pacientů s CF bez nutnosti kultivační positivity

Po provedení studie zabývající se charakteristikou a typizací bakterií *P. aeruginosa*, jsme se zaměřili na problematiku přímé detekce *Bcc*. Přestože byly navrženy protokoly pro molekulárně genetickou detekci některých druhů *Bcc* (Drevinek P. et al., 2008; Mahenthiralingam E. et al., 2000), nebyl v praxi Laboratoře molekulární genetiky (LMG), která provádí vyšetření vzorků pacientů s pražského centra pro CF pro průkaz a typizaci gramnegativních patogenů, využíván detekční postup, který by umožňoval identifikaci všech druhů v rámci komplexu. Zavedení sekvenční analýzy sedmi provozních genů metodou MLST, jež umožňuje přiřadit ST ke každému izolátu, by umožnilo jednoznačnou a robustní identifikaci všech druhů komplexu včetně nově popsanych. Nespornou výhodou využití molekulárně genetických metod k detekci *Bcc* je vysoká citlivost, která umožňuje záchyt minimálního množství bakterie ve vzorku a tím odhalení infekce řádově o týdny až měsíce dříve, než dojde k potvrzení infekce kultivačními technikami. V průběhu vyšetřování vzorků od pacientů s CF jsme se několikrát setkali se situací, kdy měl pacient pozitivní nález *Bcc* potvrzený pomocí PCR, ale kultivačně se pozitivita neprokázala z důvodu nízkého, nekultivovatelného množství bakterie ve vyšetřovaném materiálu. V takovém případě nebylo možné provést kompletní identifikaci izolátu až na úroveň kmene z důvodu nedostupnosti bakteriální kultury umožňující provedení genotypizačních metod RAPD a PFGE. Řešením bylo zavedení takové metody, která umožňuje identifikovat i typizovat kmen přímo z klinického materiálu i tehdy, kdy je kultivační průkaz negativní. Rozhodli jsme se tedy pro zavedení nested PCR amplifikace a sekvenace typu MLST. Pro dosažení stejné citlivosti metody MLST, jako byla dosažena u dříve publikovaného a rutinně využívaného dvoukolového nested-PCR (Drevinek P. et al., 2002), byl původní protokol pro MLST *Bcc* (Baldwin A. et al., 2005) modifikován a přepracován do nested PCR formátu. Primery, které v původním protokolu byly použity jako primery sekvenační, byly v naší úpravě použity i jako interní primery druhého kola nested PCR.

6.2.1. Soubor testovaných vzorků komplexu *B. cepacia*

Ověření použitelnosti MLST pro přímou detekci *Bcc* z klinického materiálu bylo provedeno na 23 vzorcích sput získaných od 17 různých pacientů s CF, u kterých byla v předchozích vyšetřeních prokázána infekce způsobená některým z druhů *Bcc* (u 10 vzorků byla současně prokázána pozitivita na přítomnost *P. aeruginosa*). Druhovému složení infikujících kmenů

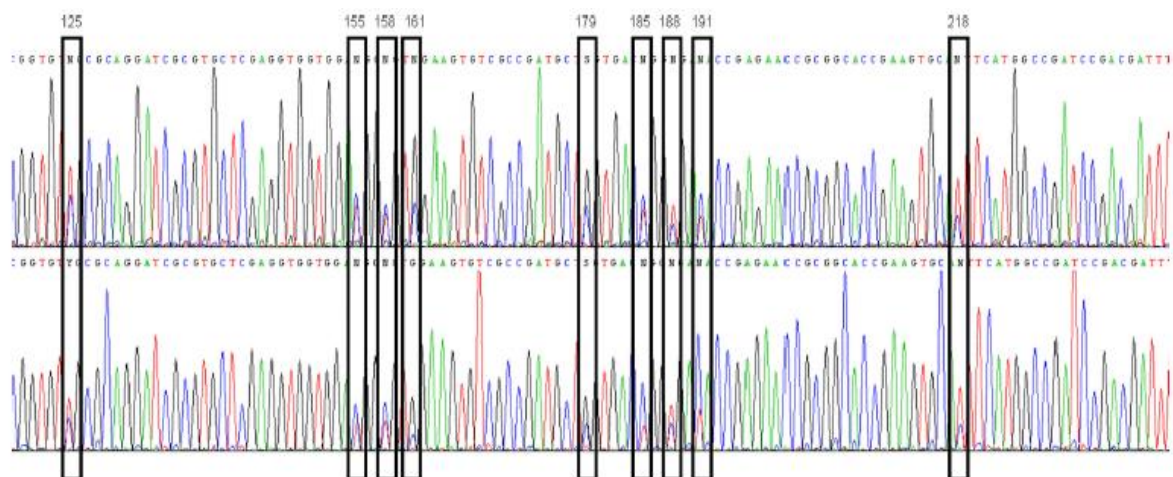
přítomných v testovaných sputech, určené na základě specifických PCR zaměřených na polymorfizmy genu *recA*, bylo následující: 10 vzorků s *B. cenocepacia* IIIA, dva vzorky s *B. cenocepacia* IIIB, čtyři vzorky s *B. multivorans*, tři vzorky *B. stabilis* a čtyři vzorky s *Bcc*, u nichž se nepodařilo stanovit druhovou příslušnost. Dle výsledků kultivace a nested-PCR bylo složení testovaných sput následující: 8 sput bylo kultivačně pozitivních, 15 kultivačně negativních; 9 sput bylo pozitivních na *Bcc* v prvním kole nested-PCR, 14 sput pak pozitivních na *Bcc* pouze v druhém kole.

Námi navržené vyšetřovací schéma klinického materiálu pro přímou *Bcc* pomocí MLST překonalo původně používané schéma nested-PCR a druhově specifických reakcích založených na polymorfizmu genu *recA*. Navrženým protokolem se podařilo určit druhovou příslušnost infikujících kmenů v rámci *Bcc* u všech 23 analyzovaných vzorků sput včetně těch, které byly kultivačně nedetekovatelné a negativní po prvním kole PCR. Charakteristika jednotlivých vzorků a sumarizace výsledků jsou uvedeny v tab. 5. V případě negativního výsledku v prvním kole PCR reakce, byl vzorek v druhém kole testován na výskyt všech sedmi alel. Celkem tedy bylo provedeno 161 reakcí a pouze jedna reakce opakovaně neposkytla relevantní výsledek. Jednalo se o reakci pro detekci alely *phaC* u vzorku 5443, nicméně ST typ infikujícího kmene byl stanoven analýzou jiného vzorku pacienta.

Pomocí MLST se podařilo určit i druhovou příslušnost kmenů přítomných ve čtyřech vzorcích sputa (vzorky pacientů 9 a 10), u kterých nested-PCR nebyla úspěšná, nebo neposkytovala jednoznačný výsledek. V případě vzorků 4871 a 5445 nebyla, ani přes opakované testování, druhová příslušnost bakteriálního kmene pomocí druhově specifických reakcí stanovena a kmeny přítomné ve vzorcích 4941 a 5315 byly zařazeny do druhu *B. cenocepacia*. Provedením MLST byl ve všech těchto vzorcích sput identifikován ST 102, který náleží do *B. contaminans*: Navíc v případě izolátů 4871 a 5315 byla odhalena koexistence dvou různých ST typů – ST 102 a ST 482, tedy dva různé kmeny druhu *B. contaminans*. Tyto dva kmeny se vzájemně liší sekvencemi ve všech sedmi alelách vyšetřovaných provozních genů, přičemž polymorfizmus alely genu *gyrB* je nejvýraznější – je patrný hned v 18 různých nukleotidech. Přítomnost dvou různých nukleotidů v alele je ukázána na obr. 3, kde jsou jasně rozeznatelné dva píky představující přítomnost dvou rozdílných nukleotidů na dané pozici. Zjištěním možné koexistence dvou různých kmenů *B. contaminans* ve sputu pacienta 9 byla provedena podrobnější analýza kultury ze sputa 4941, u něhož analýza MLST prokázala přítomnost pouze ST 482. Analýzou 50 jednotlivě narostlých kolonií, které byly z této kultury získány, byla u pěti z nich potvrzena kmenová příslušnost k ST 102. Pro provedení studií zabývajících se koinfekcemi nebo nahrazením jednoho kmene jiným kmenem *Bcc* bylo doposud

nezbytné úspěšné získání čisté bakteriální kultury. Zde popsaná metoda MLST tak kromě přímé detekce a identifikace jednotlivých kmenů v rámci *Bcc*, umožňuje i identifikaci smíšených populací bez nutnosti práce s čistou bakteriální kulturou.

Hlavním možným omezením využití MLST k detekci přímo z klinického materiálu byla obava z případně zkřížené reaktivity primerů s DNA jiného původu než bakterií *Bcc*, která je v klinickém materiálu přítomná. Tyto obavy však byly zbytečné. Získané výsledky sekvenací, ať už byly použity produkty z prvního, nebo druhého kola, byly jednoznačné a ani lidská DNA ani DNA ostatních bakterií, které nenáleží do *Bcc*, negativně neovlivnily výsledky MLST.



Obrázek 3. Ukázka sekvenačního chromatogramu při analýze MLST vzorku 5315 od pacienta 9, u kterého byly identifikovány dva různé kmeny *B. contaminans* (ST 102 a ST 482). Zvýrazněny jsou nukleotidové polymorfizmy v homologních pozicích alel genu *gyrB*.

Tabulka 5. Výsledky analýzy *Bcc* získaných ze sput pacientů s CF – porovnání výsledků získaných nested – PCR a MLST

		DETEKCE A IDENTIFIKACE POMOCÍ KULTIVACE a NESTED – PCR			MLST TYPIZACE	
Pacient č.	Vzorek č.	Kultivační pozitivita (ano/ne)	Kolo PCR, ve kterém byl vzorek pozitivní	Species	ST	Species
1	5884	Ano	1.	<i>B. cenocepacia</i> IIIA	32	<i>B. cenocepacia</i> IIIA
2	6140	Ano	1.	<i>B. cenocepacia</i> IIIA	32	<i>B. cenocepacia</i> IIIA
3	5475	Ano	1.	<i>B. cenocepacia</i> IIIA	32	<i>B. cenocepacia</i> IIIA
4	5938	Ne	2.	<i>B. cenocepacia</i> IIIA	32	<i>B. cenocepacia</i> IIIA
5	5883	Ano	2.	<i>B. cenocepacia</i> IIIA	211	<i>B. cenocepacia</i> IIIA
6	5780	Ne	2.	<i>B. cenocepacia</i> IIIA	234	<i>B. cenocepacia</i> IIIA
7	6144	Ano	1.	<i>B. cenocepacia</i> IIIA	234	<i>B. cenocepacia</i> IIIA
8	5911	Ano	1.	<i>B. cenocepacia</i> IIIA	234	<i>B. cenocepacia</i> IIIA
9	4871	Ano	2.	Neurčeno	102, 482	<i>B. contaminans</i>
	4941	Ano	1.	<i>B. cenocepacia</i> IIIA	482	<i>B. contaminans</i>
	5315	Ano	1.	<i>B. cenocepacia</i> IIIA	102, 482	<i>B. contaminans</i>
	5445	Ne	2.	Neurčeno	482	<i>B. contaminans</i>
10	5662	Ano	2.	Neurčeno	102	<i>B. contaminans</i>
	6070	Ne	2.	Neurčeno	102	<i>B. contaminans</i>
11	5983	Ano	1.	<i>B. cenocepacia</i> IIIB	184	<i>B. cenocepacia</i> IIIB
12	6072	Ano	2.	<i>B. cenocepacia</i> IIIB	184	<i>B. cenocepacia</i> IIIB
13	5699	Ano	1.	<i>B. multivorans</i>	180	<i>B. multivorans</i>
14	5781	Ne	2.	<i>B. multivorans</i>	564	<i>B. multivorans</i>
	5984	Ne	2.	<i>B. multivorans</i>	564	<i>B. multivorans</i>
15	5747	Ne	2.	<i>B. multivorans</i>	562	<i>B. multivorans</i>
16	4894	Ne	2.	<i>B. stabilis</i>	51	<i>B. stabilis</i>
17	4934	Ano	2.	<i>B. stabilis</i>	563	<i>B. stabilis</i>
	5702	Ano	2.	<i>B. stabilis</i>	563	<i>B. stabilis</i>

6.3. Studium inzerčních sekvencí u *B. cenocepacia* a vliv stresových podmínek na jejich přeskupování

Využitím metody MLST bylo prokázáno, že izoláty získané od českých pacientů s CF jsou úzce příbuzné a náleží do epidemického kmene CZ1, přestože jejich makrorestrikční profily byly značně variabilní. Předpokládali jsme, že tato variabilita může být způsobena genomickými přestavbami vyvolanými přeskupováním IS. Celogenomová sekvenční analýza kmene J2315 prokázala přítomnost minimálně 22 IS, z nichž čtyři jsou přítomné ve více kopiích. Jde o IS407 (13 kopií), ISBcen8 (12 kopií), ISBcen9 (9 kopií) a ISBcen20 (9 kopií) (Holden M.T. et al., 2009). Již dříve bylo publikováno, že stresové faktory, jako je vysoká teplota nebo hladovění, mají dopad na zvýšenou transpozici IS (Ilves H. et al., 2001; Ohtsubo Y. et al., 2005). Dalším stresovým faktorem, který by mohl vyvolat zvýšené přeskupování IS je vystavení bakteriálních kultur reaktivním formám kyslíku.

Rozhodli jsme se tedy stanovit rozmístění vybraných IS v genomu kmene CZ1 a posoudit jejich možnou souvislost s variabilitou makrorestrikčních profilů. Dále pak zhodnotit, zda navození různých stresových podmínek v laboratorním prostředí spouští zvýšené přeskupování IS u kmenů CZ1 a J2315.

6.3.1. Soubor testovaných bakteriálních kmenů

Celkem bylo testováno 31 izolátů *B. cenocepacia* náležejících ke čtyřem ST definovaným pomocí RAPD/PFGE a MLST. Šlo o 14 izolátů CZ1 (ST 32), šest izolátů ST 28 (ET12), sedm izolátů ST 234 a čtyři izoláty ST 210. Všechny tyto izoláty byly ze sbírky Cardiffské univerzity ve Velké Británii.

6.3.2. RFLP a Southern hybridizace

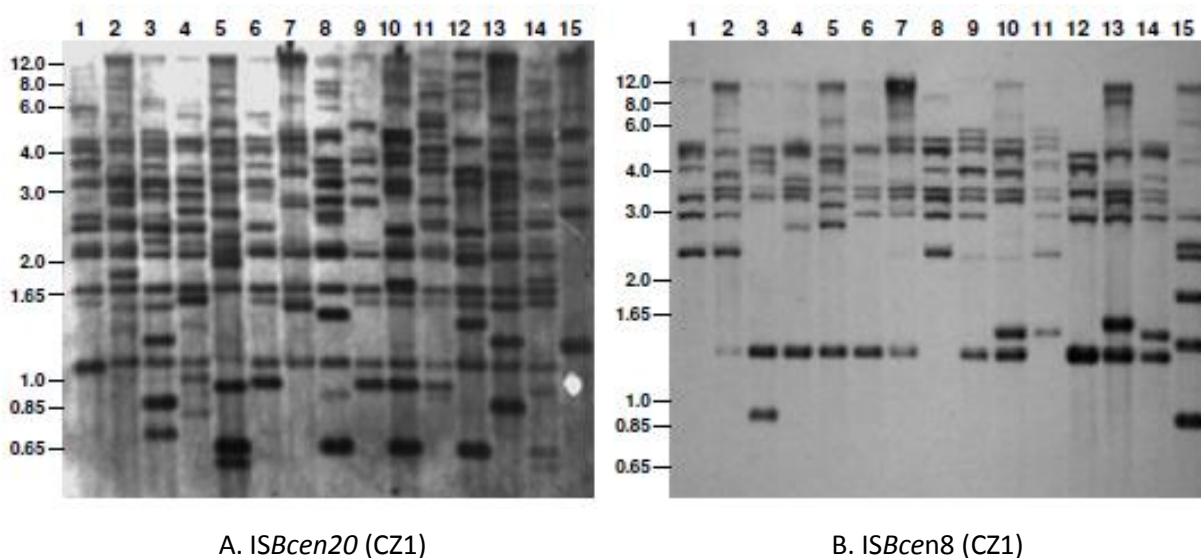
Pro stanovení přítomnosti vybraných IS, homologních k IS, které se vyskytují ve známém genomu kmene J2315, bylo pomocí RFLP a Southern hybridizace (viz 5.3.1) analyzováno celkem 14 izolátů CZ1 (ST 32) získaných od různých českých pacientů s CF. Pozornost byla zaměřena na přítomnost homologů čtyř vybraných IS – ISBcen9, IS407, ISBcen20 a ISBcen8. Během naší studie nebyla u zkoumaných izolátů kmene CZ1 zjištěna přítomnost žádné IS homologní k ISBcen9 a IS407. Zbývající analyzované IS byly u izolátů nalezeny hned v několika kopiích, jejichž počet se v případě ISBcen20 pohyboval v rozmezí 12 až 19 kopií na genom, v případě ISBcen8 šlo o 6 až 12 kopií (obr. 4). Při porovnání

jednotlivých profilů získaných pomocí RFLP s následnou Southern hybridizací byla u *ISBcen20* patrná vysoká variabilita – pouze šest z testovaných 14 izolátů vykazovalo více než 50 % podobnost. Při použití stejné hladiny podobnosti u porovnání RFLP profilů pro *ISBcen8* byla situace zcela odlišná. Většina (11 ze 14 izolátů) měla více jak polovinu shodně umístěných proužků. Tyto výsledky naznačují, že inzerční homolog *ISBcen20* u izolátů CZ1 je oproti *ISBcen8* méně stabilní a v důsledku vyšší aktivity v přeskupování a změnách počtu kopií.

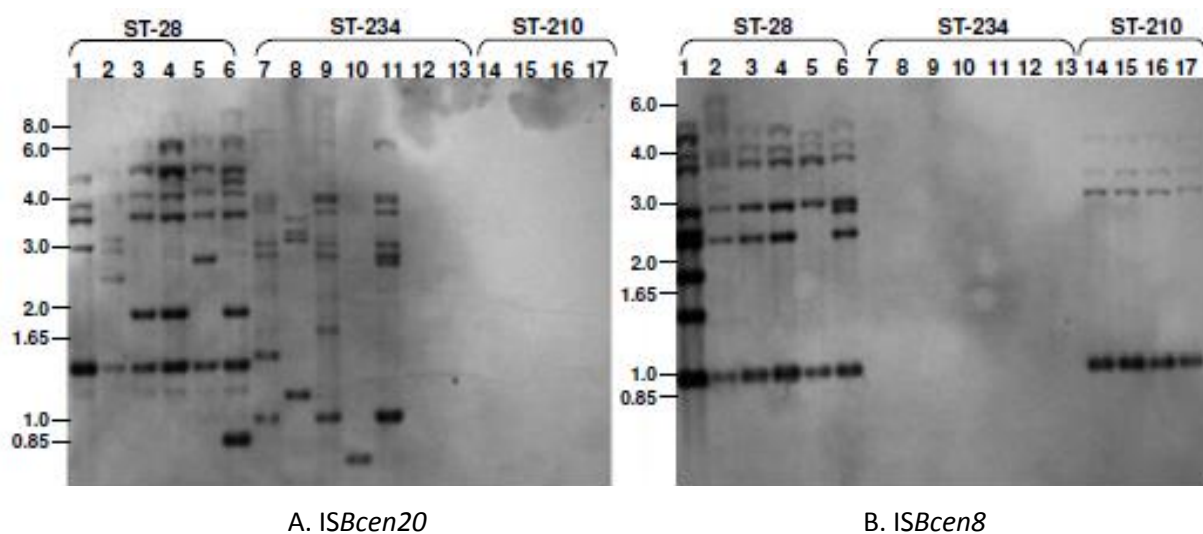
Kromě CZ1 byly testovány i izoláty jiných kmenů *B. cenocepacia* IIIA. Šlo o ST 28, ST 234 a ST 210. Profily izolátů náležících k ST 28 a ST 234 taktéž obsahovaly větší počet kopií homologních sekvencí *ISBcen20* a *ISBcen8*. Výsledky získané porovnáním profilů pro *ISBcen20* korelovaly s výsledky analýzy CZ1 a potvrdily vysokou variabilitu v počtu a lokalizaci na genomu (obr. 5).

Kromě toho analýza ST 234 prokázala, že dva ze sedmi analyzovaných izolátů zcela postrádaly *ISBcen20*. Tento výsledek naznačuje nejen pozitivní, ale i negativní selekci vůči *ISBcen20*. U ST 210 byla zjištěna pouze *ISBcen8* a to u všech testovaných izolátů.

Vzhledem k předchozím výsledkům, které naznačily vysokou rozmanitost v počtu i rozmístění *ISBcen20* a představě, že právě tato IS je aktivním elementem přispívajícím k rychlým genomickým přestavbám viditelným v makrorestrikčních profilech (Drevinek P. et al., 2005), se naše pozornost dále zaměřila na tuto inzerční sekvenci.



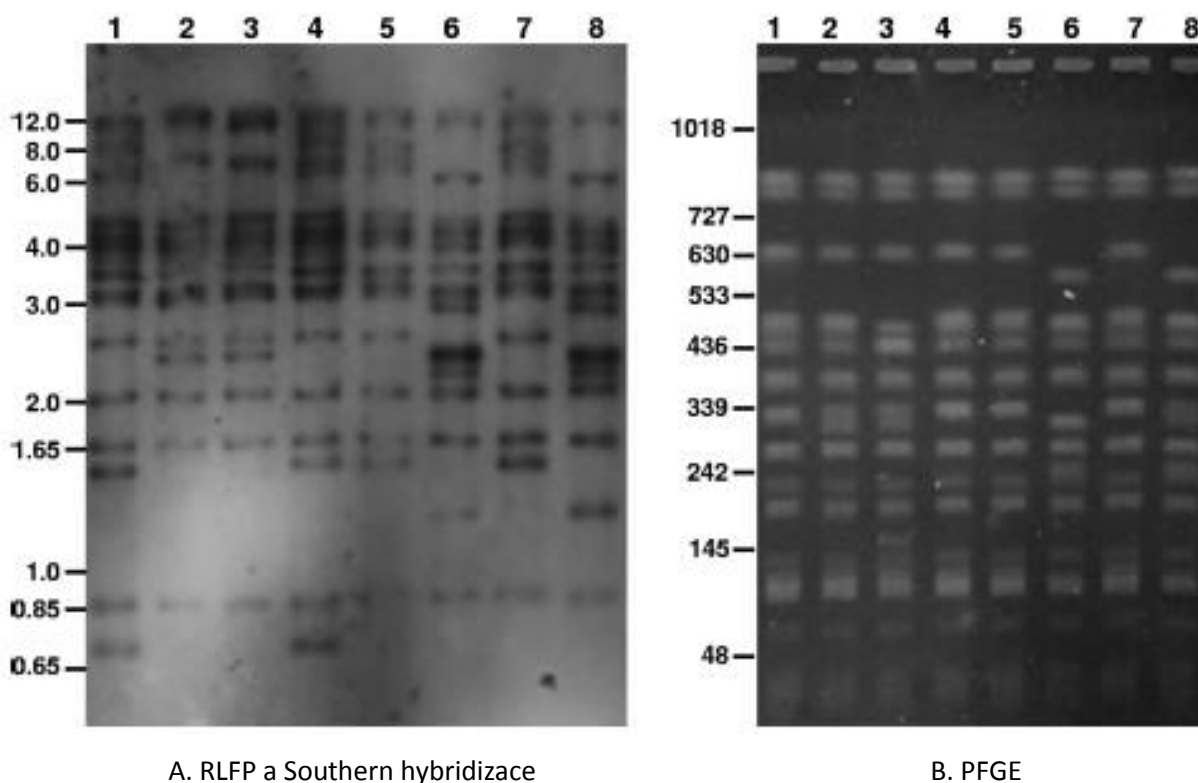
Obrázek 4. Výsledky Southern hybridizace izolátů CZ1 se sondami pro *ISBcen20* (A) a *ISBcen8* (B). Pořadí izolátů CZ1: BCC0817, BCC0818, BCC0961, BCC0851, BCC0896, BCC0885, BCC1110, BCC1114, BCC1111, BCC1112, BCC1113, BCC1121, BCC1126, BCC1128. Kontrolou je izolát J2315 (ST 28) v pozici 15. Patrná je poměrně vysoká variabilita profilů mapující počet a rozmístění *ISBcen20*. Oproti tomu v případě *ISBcen8* je rozmístění a počet IS podobné.



Obrázek 5. Southern hybridizace izolátů tří různých ST *B. cenocepacia* se sondou pro *ISBcen20* (A) a *ISBcen8* (B). Prvních šest pozic představuje izoláty ST 28 (J2315, BCC0313, BCC0162, BCC0163, BCC0164 a BCC0077); následují izoláty ST 234 (BCC0575, BCC0107, BCC1168, BCC0078, BCC0534, BCC0222 a BCC0223); poslední jsou izoláty ST 210 (BCC0536, BCC0541, BCC0514 a BCC0098). U kmene CZ1 i izolátů ostatních ST je patrná heterogenita v případě *ISBcen20*. Naproti tomu *ISBcen8* je u různých izolátů téhož ST stabilnější s ohledem na počet a rozmístění

6.3.3. Vliv stresových podmínek na přesun *ISBcen20*

Detekce pohybu *ISBcen20* vlivem nejrůznějších stresových podmínek byla provedena na izolátu CZ1 č. 1238. Jeho subkultury byly postupně vystaveny sérii sedmi pasáží, tepelnému šoku a růstu v subinhibiční koncentraci peroxidu vodíku (viz 5.3.2, 5.3.3, 5.3.4). V případě sériového pasážování a expozice teplotnímu šoku nebyly pozorovány žádné změny v přeskupování *ISBcen20*. Naproti tomu, při vystavení kultury prostředí 0,01% peroxidu vodíku došlo k jasnému přeskupení *ISBcen20*. V případě RFLP měl pouze jeden ze sedmi testovaných izolátů shodný profil s původním izolátem 1238 (obr. 6). Pomocí PFGE byly získány čtyři rozdílné makrorestrikční profily, které se lišily ve více než pěti pruzích. U čtyř ze sedmi analyzovaných subkultur byl zjištěn shodný makrorestrikční profil. Žádný ze získaných profilů nebyl shodný s profilem původního izolátu 1238.

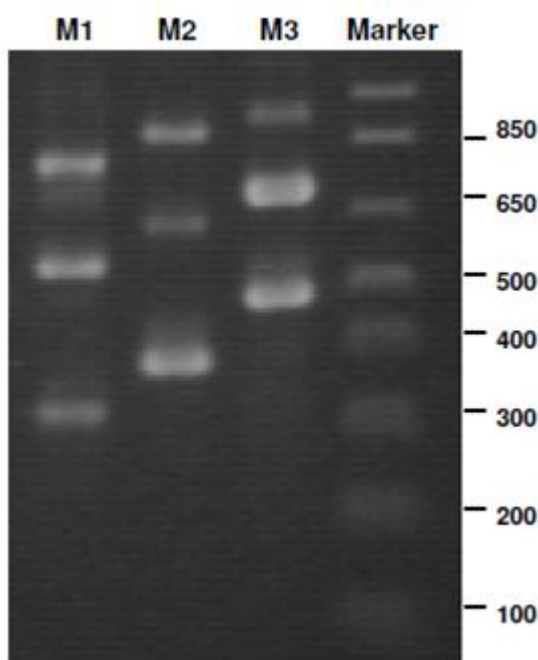


Obrázek 6. Analýza sedmi kolonií odvozených od kultury CZ1-1238, která byla vystavena subinhibiční koncentraci peroxidu vodíku. U RFLP (A) v pozici 1-7 jsou deriváty CZ1-1238, v pozici 8 je neexponovaný izolát CZ1-1238. RFLP profily izolátů v pozicích 1 a 4; 2 a 3; 5 a 7; 6 a 7 byly vzájemně totožné. V případě PFGE (B) byly nerozlišitelné profily izolátů v pozici 1, 4, 5 a 7.

6.3.4. Přemíst'ování *ISBcen20* u kmene J2315 (ST 28)

Posledním dílčím úkolem této práce byla detekce *ISBcen20* a stanovení frekvence jejího přemíst'ování mechanismem „cut and paste“ v genomu kmene *B. cenocepacia* J2315

(viz 5.3.6). Vzhledem ke znalosti kompletní sekvence genomu byla transpozice jednotlivých *ISBcen20* sledována pomocí speciálně navržených reakcí multiplex PCR. Analyzováno bylo celkem 96 kolonií derivovaných z kmene J2315, které byly získány napěstováním původního kmene J2315 v prostředí 0,1% peroxidu vodíku. Na rozdíl od výsledků získaných testováním subkultur odvozených od CZ1–1238 byl u všech testovaných subkultur J2315 zjištěn nezměněný počet *ISBcen20*, tedy devět kopií, v původním umístění bez známek přemístění. Pro možné přemístování IS vlivem vystavení podmínkám subinhibiční 0,1% koncentrace peroxidu vodíku jinými mechanismy, které nejsou detekovatelné pomocí navrženého multiplex PCR, které, bylo následně analyzováno sedm náhodně vybraných kolonií, u kterých byla provedena makrorestrikční analýza a RFLP se Southern hybridizací pro *ISBcen20*. Ani pomocí těchto technik nebyly patrné jakékoli změny v uspořádání. Z těchto výsledků vyplývá, že *ISBcen20* u kmene J2315 nepodléhá, na rozdíl od CZ1–1238, reorganizaci v důsledku oxidativního stresu v subinhibičním prostředí peroxidu.



Obrázek 7. Ukázka multiplex PCR pro detekci devíti kopií *ISBcen20* přítomných u kmene J2315. Pozice M1 až M3 reprezentují výsledky tří reakcí multiplex PCR, při kterých dochází vždy k detekci tří kopií *ISBcen20* s různou polohou v genomu. M1 zahrnuje *ISBcen20* – 1, 4 a 7, M2 *ISBcen20* – 2, 5 a 8 a M3 *ISBcen20* – 3, 6 a 9.

7. DISKUZE

7.1. Studium vlastností a klonálních vazeb izolátů *P. aeruginosa* získaných od pacientů pražského centra pro léčbu CF

Chronické infekce dýchacích cest pacientů s CF způsobené *P. aeruginosa* doprovázejí časté akutní exacerbace (Jones A.M. et al., 2010) a mají za následek postupné poškození respiračního traktu vedoucí k bronchiektáziím a respiračnímu selhání (Kerem E. et al., 1990a). Obecně platí, že infekce propukají již v raném věku pacienta a v dospělosti je infikováno tímto patogenem až 80 % nemocných s CF. Většina izolátů z těchto infekcí tvoří mukoidní kolonie a jejich fenotyp odpovídá izolátům z vnějšího prostředí. Díky tomu se dlouhou dobu předpokládalo, že hlavním zdrojem infekcí *P. aeruginosa* je právě toto prostředí. V posledních dvaceti letech však byla publikována řada prací, které popisují výskyt epidemických kmenů a jejich rozšíření mezi pacienty s CF (Jones A.M. et al., 2001; Al-Aloul M. et al., 2004; Armstrong D.S. et al., 2002; Brimicombe R.W. et al., 2008). Některé z těchto kmenů jsou spojovány s klinickým zhoršením stavu pacienta navzdory intenzivní antibiotické léčbě (Aaron S.D. et al., 2010; Griffiths A.L. et al., 2012; Jones A.M. et al., 2005; Fothergill J.L. et al., 2012). Vzhledem k vysoké prevalenci infekce *P. aeruginosa* a výskytu epidemického kmene *B. cenocepacia* v pražském centru pro léčbu CF byla provedena podrobná analýza izolátů *P. aeruginosa* s cílem potvrdit nebo vyloučit výskyt epidemického kmene nebo kmenů.

Genotypizace s využitím citlivých typizačních metod AFLP a makrorestrikční analýzy neprokázala u pacientů pražského centra pro CF rozšíření infekce způsobené epidemickými kmeny *P. aeruginosa*. Fingerprintové profily získané pomocí obou metod byly značně heterogenní. Shlukovou analýzou profilů AFLP byly na 85 % hladině podobnosti zjištěny pouze tři minoritní shluky, které obsahovaly izoláty od různých pacientů. Naše výsledky tak ukázaly vysokou genetickou diverzitu studované populace *P. aeruginosa* a to, že pacienti byli infikováni vesměs jedinečnými (sporadickými) kmeny z prostředí. Tento závěr podpořily i výsledky vyšetření citlivosti izolátů na protipseudomonádová antibiotika. Většina bakteriálních izolátů byla na antibiotika citlivá a multirezistence se vyskytovala pouze výjimečně.

Námi získané výsledky ale reflektují pouze epidemiologickou situaci kmenů *P. aeruginosa* získaných od pacientů pražského centra pro léčbu CF. Později publikovaná studie (Nemec A. et al., 2010), která se zabývala zjištěním možné souvislosti mezi výskytem

multirezistentních kmenů *P. aeruginosa* a přítomností epidemických klonů u pacientů jednotek intenzivní péče v ČR ukázala, že převážná většina multirezistentních izolátů (82 %) *P. aeruginosa* náležela ke třem epidemickým klonům (ST 235, ST 175 a ST 132), které byly zjištěny i u pacientů v intenzivní nemocniční péči v dalších zemích (Empel J. et al., 2007; Libish B. et al., 2008; Viedma E. et al., 2009).

Vysvětlit epidemické šíření určitých kmenů a klonálních linií *P. aeruginosa* je obtížné. Předpokládá se, že významnou úlohu hraje genetická variabilita a adaptibilita a přítomnost virulentních faktorů, které jsou u epidemických kmenů hojně zastoupeny (Jeukens J. et al., 2014). Publikované analýzy genomů epidemických i sporadických kmenů umožnily identifikovat geny a funkční dráhy, které jsou asociovány s adaptibilitou bakterie. Jde zejména o geny podílející se na tvorbě biofilmu, metabolismu antibiotik, transportu, geny pro sekreci nebo iontové pumpy atd. (Dettman J.R. et al., 2013). Nejnovější poznatky o epidemických kmenech ukazují, že u těchto kmenů může docházet hypermutabilitě, jež vede ke vzniku řady subtypů (Mowat E. et al., 2011; Carter M.E. et al., 2010; Bezuidt O.K. et al., 2013). V mnoha studiích byly prokázány fenotypové varianty kmenů získaných od téhož pacienta (Workentine M.L. et al., 2013). Např. studie provedená na izolátech kmene LES získaných od 10 různých pacientů s CF prokázala vysokou rozmanitost ve faktorech virulence, auxotrofii, hypermutabilitě nebo antibiotické rezistenci (Mowat E. et al., 2011). Vzhledem k vysoké vnitrodruhové variabilitě a možnosti rychlé vnitrokmenové diverzifikace je nutná opatrnost při hodnocení situace na základě omezeného počtu izolátů. Tato data mohou být zavádějící a nemusí odrážet skutečnou epidemiologickou situaci ve studované populaci. Též analýza pouze jediného izolátu od každého pacienta může být s ohledem na zmíněnou vnitrokmenovou variabilitu zavádějící. V neposlední řadě je nutné brát v potaz i fakt, že infekce respiračního traktu u pacientů s CF mohou mít polymikrobiální charakter a k jejich pochopení je nutné rozumět vzájemnému působení jednotlivých patogenů (Workentine M.L. et al., 2013).

Kromě výše popsaných faktorů se při šíření epidemických kmenů *P. aeruginosa* uplatňují i vnější faktory např. touto bakterií kontaminované vnější prostředí. Studie provedené v souvislosti se šířením kmenů LES a MES identifikovaly oba tyto epidemické kmene ve vzorcích ovzduší odebraných z pokojů infikovaných pacientů na nemocničních chodbách a ambulantních odděleních (Jones A.M. et al., 2010; Panagea S. et al., 2003). Nelze vyloučit ani akvizici epidemických kmenů z mimonemocničního prostředí (Romling U. et al., 2005; Fothergill J.L. et al., 2012).

Poněkud překvapivá nepřítomnost epidemického kmene *P. aeruginosa* v pražském centru výrazně kontrastuje s výsledky naší předešlé studie (Drevinek P. et al., 2005), v níž jsme prokázali, že vysoká (zhruba 30 %), prevalence infekce *B. cenocepacia*, je způsobena rozšířením epidemického kmene CZ1. Naprostá většina izolátů *B. cenocepacia* (96%) testovaného souboru získaného od 67 pacientů s CF patřila k CZ1. I když příčiny rozdílů v epidemiologii obou bakterií nejsou známy, mohly k nim přispět dva faktory. Za prvé populace pacientů s CF se nemusela setkat s epidemickými kmeny *P. aeruginosa*, a tudíž nemohlo dojít ani k jejich rozšíření. Za druhé, případný rozsev epidemického kmene *P. aeruginosa* mohl být v zárodku potlačen zavedením a rigorózní aplikací separačního systému a protiepidemických opatření. Ty začaly být v pražském centru systematicky uplatňovány v roce 1998 v návaznosti na publikované práce, které identifikovaly vysoce přenosné kmeny v populacích pacientů s CF (Baldwin A. et al. 2008; Speert D.P. et al., 2002; Coenye T. et al., 2002).

Přestože rozšíření epidemického kmene *P. aeruginosa* mezi pacienty pražského centra nebylo prokázáno, nelze možnost výskytu epidemických kmenů podceňovat. Stále nejsou známy všechny cesty přenosu, jakými se epidemické kmeny šíří vliv dalších faktorů a mechanismů na rozsev epidemického kmene v dané populaci. S ohledem na stálé riziko introdukce nebo vzniku kmenů s vysokým epidemickým potenciálem je nezbytné provádět mikrobiologicko–epidemiologický dohled pomocí pravidelných kultivačních a molekulárně typizačních vyšetření klinického materiálu a dodržování definovaných protiepidemických postupů, jakými jsou přísný hygienický režim pacientů i nemocničního personálu, dezinfekční postupy a jasně definovaný protokol návštěv a hospitalizací v léčebném centru.

7.2. Identifikace a typizace bakterií komplexu *B. cepacia* pomocí MLST z klinického materiálu pacientů s CF bez nutnosti kultivační positivity

Jak bylo výše uvedeno, infekce bakteriemi *Bcc* významně ovlivňují celkový stav a dlouhodobou prognózu pacientů s CF. Včasná diagnostika a identifikace původce mají tedy zásadní význam pro léčbu těchto infekcí. Druhově specifické PCR se ukazují jako nedostačující vzhledem k narůstajícímu počtu druhů *Bcc*, zatímco doposud běžně využívané fingerprintové typizační techniky mají řadu nevýhod včetně omezené reprodukovatelnosti a rozlišovací účinnosti nebo nemožnosti mezilaboratorního srovnávání výsledků (Baldwin A, et al. 2005). Naším dalším cílem bylo proto zavést metodu MLST, která umožňuje identifikaci

bakterií *Bcc* až na úroveň kmene a to bez nutnosti kultivačního záchytu a použití čisté bakteriální kultury. Metodu jsme založili na nested-PCR, při níž byly využity již dříve publikované sady primerů (Baldwin A. et al., 2005; Spilker T. et al., 2009). Vhodným výběrem testovaného souboru jsme se pokusili obsáhnout co nejvíce druhů *Bcc* a zároveň jsme zařadili kmeny, které byly pomocí zavedeného PCR obtížně identifikovatelné nebo neidentifikovatelné, abychom si ověřili přesnost a rozlišovací schopnost metody.

Přímá detekce a identifikace pomocí MLST se ukázala jako vhodný nástroj pro identifikaci kmenů *Bcc* přímo z klinického materiálu pacientů s CF. Pomocí nově navrženého schématu MLST byly správně až na úroveň kmene identifikovány všechny kmeny přítomné v testovaných sputech pacientů, včetně čtyř, které se pomocí dosud využívaného schématu zaměřeného na gen *recA*, nepodařilo opakovaně určit. Tyto kmeny byly pomocí MLST určeny jako *B. contaminans*. Jde o druh *Bcc*, který byl popsán poměrně nedávno (Vanlaere E. et al., 2009) a nebyl tedy zahrnut ve dříve navrženém schématu druhově specifických PCR. Mimo to u dvou vzorků téhož pacienta byla pomocí MLST odhalena předchozí chybná identifikace přítomného kmene. Druhově specifickými PCR byl určen druh *B. cenocepacia* IIIA, nicméně přímá sekvenční analýza prokázala, že jde o *B. contaminans*. Využitím obecných namísto druhově specifických primerů společně se sekvenací ampliconů umožňuje pomocí MLST identifikovat všechny izoláty *Bcc* na kmenovou úroveň a rozpoznat tak i izoláty s nejasným taxonomickým zařazením. Zároveň umožňuje tvorbu přírůstkových online databází (<http://pubmlst.org/bcc/>), v nichž jsou uloženy všechny známé varianty analyzovaných alel a které umožňují mezilaboratorní analýzy i provádění globálních epidemiologických studií. MLST tedy splňuje požadavky na referenční metodu poskytující přesné, reprodukovatelné a definitivní výsledky (Baldwin A. et al., 2007; Baldwin A. et al., 2005; Dalmastrri C. et al., 2007; Wayne D.J. et al., 2007).

Další nespornou výhodou zavedené metody je možnost identifikace smíšených populací. V důsledku zjištěné přítomnosti dvou ST typů (ST 102 a ST 482) kmene *B. contaminans* ve vzorku sputa jednoho pacienta byla provedena podrobná analýza jednotlivých kolonií získaných ze vzorku sputa 4941. Zaměřili jsme se zejména na alelu *gyrB*, která je mezi nalezenými ST typy nejvíce polymorfní a zjistili jsme, že u pěti z 50 kolonií byla identifikována alelická varianta *gyrB* 76, která náleží ST 102. Přestože se zdá, že ST 482 *B. contaminans* byl kmenem převládajícím, ani jeden ze zjištěných kmenů nevyvolal u pacienta vznik chronické infekce. Následujících pět po sobě odebraných vzorků sputa v časovém rozmezí jednoho roku bylo na přítomnost *Bcc* negativní (data nejsou uvedena). Přestože přechodná koinfekce více kmeny, nebo nahrazení kmene jiným kmenem *Bcc* byla

popsána již dříve (Bernhardt S.A. et al., 2003; Yang J.H. et al., 2006; Waine D.J. et al., 2007), vyžadovaly tyto studie použití čistých bakteriálních kultur, což vždy není možné. Výše popsaná metoda MLST umožňuje tyto smíšené bakteriální kultury detekovat přímo z klinického materiálu pacienta.

Právě možnost detekovat a identifikovat příslušné kmeny bez závislosti na úspěšné kultivaci materiálu, která je především v počátečních fázích infekce, často neúspěšná vzhledem k nízké koncentraci infikujících bakterií je nespornou výhodou MLST. V takových případech může tato metoda, která využívá přímo sputum nebo jiný materiál z dýchacích cest, poskytnout taxonomickou a populačně genetickou informaci o infikujícím kmenu a umožnit tak analýzu lokální epidemiologické situace.

7.3. Studium inzerčních sekvencí *B. cenocepacia* a vliv stresových podmínek na jejich přemístování

Typizace pomocí makrorestrikční analýzy spojené s PFGE prokázala u izolátů náležejících do kmene *B. cenocepacia* CZ1 velkou rozmanitost fingerprintů (Drevinek P. et al, 2005). Důvodem této rozmanitosti mohou být přestavby genomu *B. cenocepacia* vznikající v důsledku aktivního přemístování IS (Miche L. et al., 2001). Posledním cílem této práce bylo proto posoudit vliv vnějších podmínek na aktivitu translokace těchto mobilních genetických elementů u kmene CZ1. Na základě dostupných údajů o sekvenci genomu kmene J2315 (ST 28), který je úzce příbuzný s kmenem CZ1, jsme vybrali čtyři inzerční sekvence, které se u J2315 vyskytují v největším počtu. Dvě z nich, *ISBcen20* a *ISBcen8*, byly nalezeny ve všech testovaných izolátech kmene CZ1. Naše výsledky prokázaly u izolátů kmene CZ1 vysokou variabilitu v počtu i distribuci zejména *ISBcen20*. Významné odlišnosti prokázané analýzou RFLP a následnou hybridizací se sondou pro *ISBcen20*, jsme našli nejen u CZ1, ale i u jiných epidemických linií *B. cenocepacia* (ST 28, ST 234). Pozoruhodným zjištěním bylo, že dva izoláty ST 234 neměly ve svém genomu žádnou kopii *ISBcen20*. Zda šlo o ztrátu nebo získání *ISBcen20* u ostatních izolátů nebylo rozhodnuto, nicméně zjištěný výsledek potvrdil schopnost rychlého vývoje IS u *B. cenocepacia*.

Variabilita v počtu a rozmístění *ISBcen20* u izolátů CZ1 nás vedly k domněnce, že transpoziční aktivita této IS může být experimentálně vyvolána *in vitro*. Předpokládali jsme, že přemístování IS může být stimulováno oxidačním stresem, který je typický pro prostředí dýchacích cest u pacientů s CF. Chronicky infikovaní pacienti mají ve svém respiračním traktu vysokou koncentraci reaktivních forem kyslíku (*reactive oxygen species*, ROS), které

jsou produkovány imunitním systémem pacienta jako odpověď na probíhající infekci (Van Acker H. et al 2013). Usuzuje se, že respirační patogeny infikující pacienty s CF, kódují ve svém genomu celou řadu ochranných mechanismů proti ROS, které umožňují dlouhodobé osídlení plic, např. antioxidantní enzymy, jako jsou katalázy, katalázperoxidázy u *B. cenocepacia* atd. (Lefebvre M. a Valvano M., 2001). Transkriptomické studie provedené na kmenech *B. cenocepacia*, prokázaly, že při vystavení kmenů různým stresovým podmínkám (oxidativní stres, vystavení účinkům peroxidu vodíku, teplotní šok, nízké pH, atd.) dochází ke změně exprese více jak jedné čtvrtiny genů a k zvýšené expresi virulentních faktorů (Sass A.M. et al., 2013) a přítomnost bakterií v prostředí ROS vede k indukci transkripce proteinů rezistentních k peroxidu, peroxid reduktáz, proteáz, chaperonů a dalších známých se stresem souvisejících proteinů (Drevinek P. et al., 2008; Sass A.M. et al 2013, Peeters, E. et al. 2010). Ačkoli tyto enzymy umožňují přežití bakterií v dýchacích cestách pacienta, je velmi nepravděpodobné, že dochází k neutralizaci veškerých ROS. Proto lze předpokládat, že některé další procesy umožňující přežití mikrobiomu ve stresovém prostředí. Analýza DNA z jednotlivých kolonií CZ1, které byly vystaveny oxidačnímu stresu v prostředí 0,1% peroxidu vodíku, ukázala, že došlo k přemístování *ISBcen20*, jehož pravděpodobným důsledkem byly rozdíly mezi makrorestrikčními (PFGE) profily různých izolátů kmene CZ1. Naproti tomu u izolátů J2315 nedošlo k žádným strukturálním reorganizacím genomu, přestože tyto izoláty byly vystaveny stejným stresovým podmínkám jako kmen CZ1. Všech devět kopií *ISBcen20* přítomných u J2315 obsahuje mutaci posunem čtecího rámce v genu pro transponázu (Holden M.T. et al., 2009). Neschopnost vyvolat přemístování *ISBcen20* vlivem účinku peroxidu vodíku u J2315 naznačuje, že vzniklá mutace v genu vede k expresi nefunkčního genu, nebo je v důsledku mutace exprese zcela zablokována a jde tedy pouze o pseudogen. Získané výsledky též ukazují, že vyvolání reorganizace IS v genomu vlivem stresových podmínek je kmenově specifické a může se lišit i u geneticky úzce příbuzných kmenů. Indukovanou transpozici IS studovali též Ohtsubo et al. (2005) a to na modelu environmentálních kmenů *B. multivorans*. Zjistili, že i když působením vyšších teplot došlo ke zvýšení transpozice osmi různých IS, oxidační stres žádné podobné změny nezpůsobil.

Skutečnost, že u zástupců *B. cenocepacia* nedochází vlivem teplotního šoku k přemístování IS lze vysvětlit buďto tím, že izoláty tohoto druhu jsou necitlivé k tomuto typu stresového podnětu, nebo tím, že vysoká teplota není dostatečně silný stresový stimul k vyvolání translokace IS. Každopádně je zjištění, že izoláty českého kmene CZ1 reagují na podmínky oxidačního stresu simulujícího plicní prostředí pacienta s CF, významné pro

studium dalších patogenů u pacientů s CF. Podrobnější analýza mobilních elementů a jejich vliv na reorganizaci genomu může pomoci při studiu změn ve virulenci bakterií a dopadu mikrobiálních infekcí na průběh základního onemocnění CF.

Makrorestrikční analýza (PFGE) je u mnoha bakteriálních patogenů zlatým metodickým standardem pro epidemiologickou typizaci. To však není případ *B. cenocepacia*, zejména jde-li o porovnání velkého počtu izolátů v delším časovém intervalu (Coenye T. et al., 2002). Díky relativní nestabilitě makrorestrikčních profilů mohou být získané výsledky pro stanovení epidemiologické vazby těchto izolátů zavádějící. S tímto problémem jsme byli konfrontováni již při vyhodnocování výsledků klonální příbuznosti izolátů *B. cenocepacia* od českých pacientů s CF, kdy se však i přes interpretační úskalí analýzy PFGE podařilo identifikovat epidemický kmen CZ1 (Drevinek P. et al., 2005). Výsledky pro vybrané izoláty CZ1 naznačují, že významná variabilita makrorestrikčních profilů zjištěná v předešlé studii (Drevinek P. et al., 2005) byla způsobena oxidačními stresovými podmínkami, jež indukovaly k transpozici IS a následnou redistribuci restrikčních míst pro endonukleázu *SpeI*. Vzhledem k tomu, že transpoziční aktivita IS je zjištělná už po několika hodinách růstu v přítomnosti peroxidu vodíku, lze předpokládat, že genom CZ1 se může v důsledku této zvýšené aktivity rychle diverzifikovat.

Lze shrnout, že *ISBCen20* je mobilním elementem u epidemického kmene CZ1, jehož translokační aktivitu zvyšuje přítomnost reaktivních forem kyslíku. Takto indukovaná translokace pak může urychlit mikroevoluční změny genomu a představovat jeden ze zdrojů biologické adaptability *B. cenocepacia* v průběhu infekce.

8. ZÁVĚR

STUDIUM VLASTNOSTÍ A KLONÁLNÍCH VAZEB IZOLÁTŮ *P. AERUGINOSA* ZÍSKANÝCH OD PACIENTŮ PRAŽSKÉHO CENTRA PRO LÉČBU CF

- Pomocí typizačních technik AFLP a PFGE byla posouzena genetická příbuznost 69 izolátů *P. aeruginosa* získaných od stejného počtu pacientů pražského centra pro léčbu CF.
- AFLP prokázala vysokou genotypovou rozmanitost izolátů a možnou klonální vazbu naznačila pouze v rámci několika malých skupin izolátů.
- Makrorestrikční analýza (PFGE) potvrdila výsledky AFLP; profily PFGE byly až na několik izolátů s podobnými profily AFLP vysoce heterogenní.
- Vyšetření citlivosti na antimikrobní látky ukázalo překvapivě dobrou citlivost testovaných izolátů a pouze vzácný výskyt multirezistentních kmenů.
- Nebyl tak potvrzen výskyt epidemického kmene *P. aeruginosa* mezi pacienty s CF a byla vyloučena epidemiologická souvislost mezi infekcemi. Za jejich hlavní zdroj infekce lze nadále považovat vnější prostředí.

IDENTIFIKACE A TYPIZACE BAKTERIÍ KOMPLEXU *B. CEPACIA* POMOCÍ MLST Z KLINICKÉHO MATERIÁLU PACIENTŮ S CF BEZ NUTNOSTI KULTIVAČNÍ POZITIVITY

- Zavedli jsme metodu MLST, která byla pro využití v klinické praxi upravena do nested formátu umožňující detekci a identifikaci *Bcc* přímo z klinického materiálu pacienta, bez nutnosti využití izolátu získaného z čisté bakteriální kultury.
- Pomocí MLST byla správně identifikována druhová příslušnost kmenů *Bcc* ve všech 23 testovaných vzorcích sput, podařilo se identifikovat i nově popsání druhy, pro které nebyla zavedena druhově specifická reakce založená na polymorfizmu genu *recA*.
- Podařilo se určit druhovou příslušnost infikujících kmenů u čtyř vzorků sput, které byly pomocí nested – PCR opakovaně neidentifikovatelné.
- Byla prokázána možnost identifikace koinfekce pacienta dvěma rozdílnými ST kmeny v rámci druhu *B. contaminans*.
- Navržené primery nevykazují zkříženou reaktivitu lidskou ani s bakteriální DNA jiného původu než *Bcc* a nejsou tak negativně ovlivněny výsledky MLST.

STUDIUM INZERČNÍCH SEKVENCÍ U *B. CENOCEPACIA* A VLIV STRESOVÝCH PODMÍNEK NA JEJICH PŘESKUPOVÁNÍ

- V genomu epidemického kmene ST 32, cirkulujícího mezi českými pacienty s CF byl nalezen vyšší počet kopií *ISBcen20* a *ISBcen8*. Počet *ISBcen20* se pohyboval v rozmezí 12–19 kopií na genom, *ISBcen8* pak v rozmezí 6–12 kopií na genom.
- Jednotlivé profily získané hybridizací se sondou pro *ISBcen20* měly vysokou variabilitu *ISBcen20*, a to v rozmístění i v počtu u jednotlivých izolátů ST 32. Tato variabilita potvrdila aktivní přeskupování IS v důsledku působení podmínek prostředí.
- U izolátů ST 32 (CZ1) nebyla prokázána přítomnost *ISBcen9* a *IS407*.
- Vystavení buněčných kultur ST 32 stresovým podmínkám sériového pasážování nebo teplotního šoku nevyvolalo žádné změny v přeskupování *ISBcen20*, ani reorganizaci genomu.
- Vystavení ST 32 prostředí s subinhibiční koncentrací 0,1% peroxidu vodíku, vyvolala přeskupování *ISBcen20*.
- Rozdíly v makrorestrikčních profilech jednotlivých izolátů epidemického kmene ST 32 lze vysvětlit přeskupováním IS vlivem působení stresových podmínek prostředí dýchacích cest pacientů s CF.
- Vystavení kmene ST 28, úzce příbuzného k ST 32, stejným stresovým podmínkám nevyvolalo přemísťování *ISBcen20*, ani reorganizaci genomu, které by byly zjištělné s využitím uvedených molekulárně genetických metod.
- Odlišné chování úzce příbuzných kmenů ST 32 a ST 28 ve stresových podmínkách prostředí může mít vliv na průběh infekce u pacientů s CF.

Tato práce vycházela z předešlých poznatků laboratoře molekulární genetiky 2. LF a FN Motol. Zavedením nových molekulárních metod a získáním nových poznatků o gramnegativních patogenech zaměřeného především na popsání druhového a kmenového složení bakteriálních kmenů *P. aeruginosa* a *Bcc* přítomných u pacientů s CF a studium infekce způsobené *B. cenocepacia* ST 32 zaměřené na virulenci a genomovou plasticitu.

Získané poznatky budou zohledněny v další práci, kde se zaměříme především na navržení vhodného surveillance infekcí bakterií *Bcc* ve fakultní nemocnici v Motole a studium genové exprese, markerů transmisivity a interakcí hostitelského imunitního systému s patogenem.

9. LITERATURA

- Aanensen, D. M., Spratt, B. G. (2005).** The multilocus sequence typing network: mlst.net. *Nucleic Acids Res*, 33 (Web Server issue), W728-733.
- Aaron, S. D., Vandemheen, K. L., Ramotar, K., Giesbrecht-Lewis, T., Tullis, E., Freitag, A., Paterson, N., Jackson, M., Loughheed, M. D., Dowson, C., Kumar, V., Ferris, W., Chan, F., Doucette, S., Fergusson, D. (2010).** Infection with transmissible strains of *Pseudomonas aeruginosa* and clinical outcomes in adults with cystic fibrosis. *JAMA*, 304 (19), 2145-2153.
- Al-Aloul, M., Crawley, J., Winstanley, C., Hart, C. A., Ledson, M. J., Walshaw, M. J. (2004).** Increased morbidity associated with chronic infection by an epidemic *Pseudomonas aeruginosa* strain in CF patients. *Thorax*, 59 (4), 334-336.
- Arbeit, R. D., Arthur, M., Dunn, R., Kim, C., Selander, R. K., Goldstein, R. (1990).** Resolution of recent evolutionary divergence among *Escherichia coli* from related lineages: the application of pulsed field electrophoresis to molecular epidemiology. *J Infect Dis*, 161 (2), 230-235.
- Armougom, F., Bittar, F., Stremmer, N., Rolain, J. M., Robert, C., Dubus, J. C., Sarles, J., Raoult, D., La Scola, B. (2009).** Microbial diversity in the sputum of a cystic fibrosis patient studied with 16S rDNA pyrosequencing. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 28 (9), 1151-1154.
- Armstrong, D., Bell, S., Robinson, M., Bye, P., Rose, B., Harbour, C., Lee, C., Service, H., Nissen, M., Syrmis, M., Wainwright, C. (2003).** Evidence for spread of a clonal strain of *Pseudomonas aeruginosa* among cystic fibrosis clinics. *J Clin Microbiol*, 41 (5), 2266-2267.
- Armstrong, D. S., Nixon, G. M., Carzino, R., Bigham, A., Carlin, J. B., Robins-Browne, R. M., Grimwood, K. (2002).** Detection of a widespread clone of *Pseudomonas aeruginosa* in a pediatric cystic fibrosis clinic. *Am J Respir Crit Care Med*, 166(7), 983-987.
- Baldwin, A., Mahenthiralingam, E., Drevinek, P., Pope, C., Waite, D. J., Henry, D. A., Speert, D. P., Carter, P., Vandamme, P., LiPuma, J. J., Dowson, C. G. (2008).** Elucidating global epidemiology of *Burkholderia multivorans* in cases of cystic fibrosis by multilocus sequence typing. *J Clin Microbiol*, 46(1), 290-295.
- Baldwin, A., Mahenthiralingam, E., Drevinek, P., Vandamme, P., Govan, J. R., Waite, D. J., LiPuma, J. J., Chiarini, L., Dalmastrri, C., Henry, D. A., Speert, D. P., Honeybourne, D., Maiden, M. C., Dowson, C. G. (2007).** Environmental *Burkholderia cepacia* complex isolates in human infections. *Emerg Infect Dis*, 13(3), 458-461.
- Baldwin, A., Mahenthiralingam, E., Thickett, K. M., Honeybourne, D., Maiden, M. C., Govan, J. R., Speert, D. P., Lipuma, J. J., Vandamme, P., Dowson, C. G. (2005).** Multilocus sequence typing scheme that provides both species and strain

- differentiation for the *Burkholderia cepacia* complex. *J Clin Microbiol*, 43(9), 4665-4673.
- Bernhardt, S. A., Spilker, T., Coffey, T., LiPuma, J. J. (2003).** *Burkholderia cepacia* complex in cystic fibrosis: frequency of strain replacement during chronic infection. *Clin Infect Dis*, 37(6), 780-785.
- Bernier, S. P., Nguyen, D. T., Sokol, P. A. (2008).** A LysR-type transcriptional regulator in *Burkholderia cenocepacia* influences colony morphology and virulence. *Infect Immun*, 76(1), 38-47.
- Bezuidt, O. K., Klockgether, J., Elsen, S., Attree, I., Davenport, C. F., Tummeler, B. (2013).** Intraclonal genome diversity of *Pseudomonas aeruginosa* clones CHA and TB. *BMC Genomics*, 14, 416.
- Bittar, F., Richet, H., Dubus, J. C., Reynaud-Gaubert, M., Stremler, N., Sarles, J., Raoult, D., Rolain, J. M. (2008).** Molecular detection of multiple emerging pathogens in sputa from cystic fibrosis patients. *PLoS One*, 3(8), e2908.
- Brimicombe, R. W., Dijkshoorn, L., van der Reijden, T. J., Kardoes, I., Pitt, T. L., van den Broek, P. J., Heijerman, H. G. (2008).** Transmission of *Pseudomonas aeruginosa* in children with cystic fibrosis attending summer camps in The Netherlands. *J Cyst Fibros*, 7(1), 30-36.
- Burkholder, W. H. (1950).** Sour skin, a bacterial rot of onion bulb. *Phytopathology*(40), 115-117.
- Cangelosi, G. A., Freeman, R. J., Lewis, K. N., Livingston-Rosanoff, D., Shah, K. S., Milan, S. J., Goldberg, S. V. (2004).** Evaluation of a high-throughput repetitive-sequence-based PCR system for DNA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium* complex strains. *J Clin Microbiol*, 42(6), 2685-2693.
- Carter, M. E., Fothergill, J. L., Walshaw, M. J., Rajakumar, K., Kadioglu, A., Winstanley, C. (2010).** A subtype of a *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis epidemic strain exhibits enhanced virulence in a murine model of acute respiratory infection. *J Infect Dis*, 202(6), 935-942.
- Cellini, L., Grande, R., Di Campli, E., Di Bartolomeo, S., Capodicasa, S., Marzio, L. (2006).** Analysis of genetic variability, antimicrobial susceptibility and virulence markers in *Helicobacter pylori* identified in Central Italy. *Scand J Gastroenterol*, 41(3), 280-287.
- Coenye, T., Mahenthiralingam, E., Henry, D., LiPuma, J. J., Laevens, S., Gillis, M., Speert, D. P., Vandamme, P. (2001).** *Burkholderia ambifaria* sp. nov., a novel member of the *Burkholderia cepacia* complex including biocontrol and cystic fibrosis-related isolates. *Int J Syst Evol Microbiol*, 51(Pt 4), 1481-1490.
- Coenye, T., Spilker, T., Martin, A., LiPuma, J. J. (2002).** Comparative assessment of genotyping methods for epidemiologic study of *Burkholderia cepacia* genomovar III. *J Clin Microbiol*, 40(9), 3300-3307.

- Coenye, T., Vandamme, P. (2003). Diversity and significance of *Burkholderia* species occupying diverse ecological niches. *Environ Microbiol*, 5(9), 719-729.
- Coenye T., Vandamme, P. (2006). *Burkholderia* Molecular Microbiology and Genomics. *Monographs*.
- Cramer, N., Klockgether, J., Wrasman, K., Schmidt, M., Davenport, C. F., Tummeler, B. (2011). Microevolution of the major common *Pseudomonas aeruginosa* clones C and PA14 in cystic fibrosis lungs. *Environ Microbiol*, 13(7), 1690-1704.
- Cunha, M. V., Pinto-de-Oliveira, A., Meirinhos-Soares, L., Salgado, M. J., Melo-Cristino, J., Correia, S., Barreto, C., Sa-Correia, I. (2007). Exceptionally high representation of *Burkholderia cepacia* among *B. cepacia* complex isolates recovered from the major Portuguese cystic fibrosis center. *J Clin Microbiol*, 45(5), 1628-1633.
- Currie, A. J., Speert, D. P., Davidson, D. J. (2003). *Pseudomonas aeruginosa*: role in the pathogenesis of the CF lung lesion. *Semin Respir Crit Care Med*, 24(6), 671-680.
- Dalmastri, C., Baldwin, A., Tabacchioni, S., Bevivino, A., Mahenthiralingam, E., Chiarini, L., Dowson, C. (2007). Investigating *Burkholderia cepacia* complex populations recovered from Italian maize rhizosphere by multilocus sequence typing. *Environ Microbiol*, 9(7), 1632-1639.
- De Vos, D., Lim, A., Jr., Pirnay, J. P., Struelens, M., Vandenvelde, C., Duinslaeger, L., Vanderkelen, A., Cornelis, P. (1997). Direct detection and identification of *Pseudomonas aeruginosa* in clinical samples such as skin biopsy specimens and expectorations by multiplex PCR based on two outer membrane lipoprotein genes, oprI and oprL. *J Clin Microbiol*, 35(6), 1295-1299.
- de Vrankrijker, A. M., Brimicombe, R. W., Wolfs, T. F., Heijerman, H. G., van Mansfeld, R., van Berkhout, F. T., Willems, R. J., Bonten, M. J., van der Ent, C. K. (2011). Clinical impact of a highly prevalent *Pseudomonas aeruginosa* clone in Dutch cystic fibrosis patients. *Clin Microbiol Infect*, 17(3), 382-385.
- DeRisi, J., van den Hazel, B., Marc, P., Balzi, E., Brown, P., Jacq, C., Goffeau, A. (2000). Genome microarray analysis of transcriptional activation in multidrug resistance yeast mutants. *FEBS Lett*, 470(2), 156-160.
- Dettman, J. R., Rodrigue, N., Aaron, S. D., Kassen, R. (2013). Evolutionary genomics of epidemic and nonepidemic strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(52), 21065-21070.
- Drevinek, P., Baldwin, A., Dowson, C. G., Mahenthiralingam, E. (2008). Diversity of the *parB* and *repA* genes of the *Burkholderia cepacia* complex and their utility for rapid identification of *Burkholderia* cenocepacia. *BMC Microbiol*, 8, 44.
- Drevinek, P., Hrbáková, H., Cinek, O., Bartosova, J., Nyc, O., Nemeč, A., Pohunek, P. (2002). Direct PCR detection of *Burkholderia cepacia* complex and identification of

- its genomovars by using sputum as source of DNA. *J Clin Microbiol*, 40(9), 3485-3488.
- Drevinek, P., Mahenthiralingam, E. (2010).** *Burkholderia cenocepacia* in cystic fibrosis: epidemiology and molecular mechanisms of virulence. *Clin Microbiol Infect*, 16 (7), 821-830.
- Drevinek, P., Vosahlikova, S., Cinek, O., Vavrova, V., Bartosova, J., Pohunek, P., Mahenthiralingam, E. (2005).** Widespread clone of *Burkholderia cenocepacia* in cystic fibrosis patients in the Czech Republic. *J Med Microbiol*, 54 (Pt 7), 655-659.
- Empel, J., Filczak, K., Mrówka, A., Hryniewicz, W., Livermore, D.M., Gniadkowski, M. (2007).** Outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* infections with PER - 1 extended - spectrum β - lactamase in Warsaw, Poland: further evidence for an international clonal complex. *J. Clin. Microbiol.* 45, 2829 - 2834.
- Feil, E. J., Spratt, B. G. (2001).** Recombination and the population structures of bacterial pathogens. *Annu Rev Microbiol*, 55, 561-590.
- Folkesson, A., Jelsbak, L., Yang, L., Johansen, H. K., Ciofu, O., Hoiby, N., Molin, S. (2012).** Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to the cystic fibrosis airway: an evolutionary perspective. *Nat Rev Microbiol*, 10(12), 841-851.
- Fothergill, J. L., Walshaw, M. J., Winstanley, C. (2012).** Transmissible strains of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infections. *Eur Respir J*, 40 (1), 227-238.
- Garaizar, J., Rementeria, A., Porwollik, S. (2006).** DNA microarray technology: a new tool for the epidemiological typing of bacterial pathogens? *FEMS Immunol Med Microbiol*, 47 (2), 178-189.
- Gillis, M., Van Van, T., Bardin, R., Goor, M., Willems, A., Segers, P., Kersters, K., Heulin, T., Fernandez, M.P. (1995).** Polyphasic taxonomy in the genus *Burkholderia* leading to a description of the genus and proposition of *Burkholderia wietnamiensis* sp. nov. N₂-fixing isolates from rice in Vietnam. *Int J Syst Bact.*, 45(274-289).
- Golini, G., Cazzola, G., Fontana, R. (2006).** Molecular epidemiology and antibiotic susceptibility of *Burkholderia cepacia*-complex isolates from an Italian cystic fibrosis centre. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 25(3), 175-180.
- Govan, J. R., Brown, A. R., Jones, A. M. (2007).** Evolving epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* and the *Burkholderia cepacia* complex in cystic fibrosis lung infection. *Future Microbiol*, 2(2), 153-164.
- Govan, J. R., Hughes, J. E., Vandamme, P. (1996).** *Burkholderia cepacia*: medical, taxonomic and ecological issues. *J Med Microbiol*, 45(6), 395-407.
- Graindorge, A., Menard, A., Neto, M., Bouvet, C., Miollan, R., Gaillard, S., de Montclos, H., Laurent, F., Cournoyer, B. (2010).** Epidemiology and molecular characterization

- of a clone of *Burkholderia cenocepacia* responsible for nosocomial pulmonary tract infections in a French intensive care unit. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 66(1), 29-40.
- Griffiths, A. L., Jansen, K., Carlin, J. B., Grimwood, K., Carzino, R., Robinson, P. J., Massie, J., Armstrong, D. S. (2005).** Effects of segregation on an epidemic *Pseudomonas aeruginosa* strain in a cystic fibrosis clinic. *Am J Respir Crit Care Med*, 171(9), 1020-1025.
- Griffiths, A. L., Wurzel, D. F., Robinson, P. J., Carzino, R., Massie, J. (2012).** Australian epidemic strain *pseudomonas* (AES-1) declines further in a cohort segregated cystic fibrosis clinic. *J Cyst Fibros*, 11(1), 49-52.
- Grothues, D., Koopmann, U., von der Hardt, H., Tummler, B. (1988).** Genome fingerprinting of *Pseudomonas aeruginosa* indicates colonization of cystic fibrosis siblings with closely related strains. *J Clin Microbiol*, 26(10), 1973-1977.
- Grundmann, H., Schneider, C., Hartung, D., Daschner, F. D., Pitt, T. L. (1995).** Discriminatory power of three DNA-based typing techniques for *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol*, 33(3), 528-534.
- Harris, J. K., De Groote, M. A., Sagel, S. D., Zemanick, E. T., Kapsner, R., Penvari, C., Kaess, H., Deterding, R. R., Accurso, F. J., Pace, N. R. (2007).** Molecular identification of bacteria in bronchoalveolar lavage fluid from children with cystic fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(51), 20529-20533.
- Holden, M. T., Seth-Smith, H. M., Crossman, L. C., Sebahia, M., Bentley, S. D., Cerdeno-Tarraga, A. M., Thomson, N. R., Bason, N., Quail, M. A., Sharp, S., Cherevach, I., Churcher, C., Goodhead, I., Hauser, H., Holroyd, N., Mungall, K., Scott, P., Walker, D., White, B., Rose, H., Iversen, P., Mil-Homens, D., Rocha, E. P., Fialho, A. M., Baldwin, A., Dowson, C., Barrell, B. G., Govan, J. R., Vandamme, P., Hart, C. A., Mahenthiralingam, E., Parkhill, J. (2009).** The genome of *Burkholderia cenocepacia* J2315, an epidemic pathogen of cystic fibrosis patients. *J Bacteriol*, 191(1), 261-277.
- Hubner, A., Hendrickson, W. (1997).** A fusion promoter created by a new insertion sequence, IS1490, activates transcription of 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid catabolic genes in *Burkholderia cepacia* AC1100. *J Bacteriol*, 179(8), 2717-2723.
- Hutchinson, G. R., Parker, S., Pryor, J. A., Duncan-Skingle, F., Hoffman, P. N., Hodson, M. E., Kaufmann, M. E., Pitt, T. L. (1996).** Home-use nebulizers: a potential primary source of *Burkholderia cepacia* and other colistin-resistant, gram-negative bacteria in patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol*, 34(3), 584-587.
- Chambers, D., Scott, F., Bangur, R., Davies, R., Lim, A., Walters, S., Smith, G., Pitt, T., Stableforth, D., Honeybourne, D. (2005).** Factors associated with infection by *Pseudomonas aeruginosa* in adult cystic fibrosis. *Eur Respir J*, 26(4), 651-656.
- Chen, J. S., Witzmann, K. A., Spilker, T., Fink, R. J., LiPuma, J. J. (2001).** Endemicity and inter-city spread of *Burkholderia cepacia* genomovar III in cystic fibrosis. *J Pediatr*, 139(5), 643-649.

- Cheng, K., Smyth, R. L., Govan, J. R., Doherty, C., Winstanley, C., Denning, N., Heaf, D. P., van Saene, H., Hart, C. A. (1996).** Spread of beta-lactam-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a cystic fibrosis clinic. *Lancet*, 348(9028), 639-642.
- Ilves, H., Horak, R., Kivisaar, M. (2001).** Involvement of sigma(S) in starvation-induced transposition of *Pseudomonas putida* transposon Tn4652. *J Bacteriol*, 183(18), 5445-5448.
- Jackson, G. W., McNichols, R. J., Fox, G. E., Willson, R. C. (2006).** Bacterial genotyping by 16S rRNA mass cataloging. *BMC Bioinformatics*, 7, 321.
- Jayaswal, R. K., Fernandez, M., Upadhyay, R. S., Visintin, L., Kurz, M., Webb, J., Rinehart, K. (1993).** Antagonism of *Pseudomonas cepacia* against phytopathogenic fungi. *Curr Microbiol*, 26(1), 17-22.
- Jeukens, J., Boyle, B., Kukavica-Ibrulj, I., Ouellet, M. M., Aaron, S. D., Charette, S. J., Fothergill, J. L., Tucker, N. P., Winstanley, C., Levesque, R. C. (2014).** Comparative genomics of isolates of a *Pseudomonas aeruginosa* epidemic strain associated with chronic lung infections of cystic fibrosis patients. *PLoS One*, 9(2), e87611.
- Johansen, H. K., Hoiby, N. (1992).** Seasonal onset of initial colonisation and chronic infection with *Pseudomonas aeruginosa* in patients with cystic fibrosis in Denmark. *Thorax*, 47(2), 109-111.
- Jones, A. M., Dodd, M. E., Govan, J. R., Doherty, C. J., Smith, C. M., Isalska, B. J., Webb, A. K. (2005).** Prospective surveillance for *Pseudomonas aeruginosa* cross-infection at a cystic fibrosis center. *Am J Respir Crit Care Med*, 171(3), 257-260.
- Jones, A. M., Dodd, M. E., Morris, J., Doherty, C., Govan, J. R., Webb, A. K. (2010).** Clinical outcome for cystic fibrosis patients infected with transmissible *Pseudomonas aeruginosa*: an 8-year prospective study. *Chest*, 137(6), 1405-1409.
- Jones, A. M., Govan, J. R., Doherty, C. J., Dodd, M. E., Isalska, B. J., Stanbridge, T. N., Webb, A. K. (2001).** Spread of a multiresistant strain of *Pseudomonas aeruginosa* in an adult cystic fibrosis clinic. *Lancet*, 358(9281), 557-558.
- Kakinuma, Y., Goldsmith, C. E., Watt, A., Elborn, J. S., Maeda, Y., Rendall, J. C., Hall, V., McCaughan, J., Reid, A., Millar, B. C., Matsuda, M., Moore, J. E. (2010).** Molecular conservation within LES9F and PS21 liverpool epidemic strain (LES) markers in wild-type clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolated from the sputum of adult patients with cystic fibrosis. *Br J Biomed Sci*, 67(2), 87-88.
- Kelly, N. M., Fitzgerald, M. X., Tempany, E., O'Boyle, C., Falkiner, F. R., Keane, C. T. (1982).** Does pseudomonas cross-infection occur between cystic-fibrosis patients. *Lancet*, 2(8300), 688-690.

- Kerem, E., Corey, M., Gold, R., Levison, H. (1990a).** Pulmonary function and clinical course in patients with cystic fibrosis after pulmonary colonization with *Pseudomonas aeruginosa*. *J Pediatr*, 116(5), 714-719.
- Kerem, E., Corey, M., Stein, R., Gold, R., Levison, H. (1990b).** Risk factors for *Pseudomonas aeruginosa* colonization in cystic fibrosis patients. *Pediatr Infect Dis J*, 9(7), 494-498.
- Kilbane, J. J., Chatterjee, D. K., Karns, J. S., Kellogg, S. T., Chakrabarty, A. M. (1982).** Biodegradation of 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid by a pure culture of *Pseudomonas cepacia*. *Appl Environ Microbiol*, 44(1), 72-78.
- Klockgether, J., Cramer, N., Wiehlmann, L., Davenport, C. F., Tummler, B. (2011).** *Pseudomonas aeruginosa* Genomic Structure and Diversity. *Front Microbiol*, 2, 150.
- Klockgether, J., Wurdemann, D., Reva, O., Wiehlmann, L., Tummler, B. (2007).** Diversity of the abundant pKLC102/PAGI-2 family of genomic islands in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*, 189(6), 2443-2459.
- Knoester, M., de Boer, M. G., Maarleveld, J. J., Claas, E. C., Bernards, A. T., de Jonge, E., van Dissel, J. T., Veldkamp, K. E. (2014).** An integrated approach to control a prolonged outbreak of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in an intensive care unit. *Clin Microbiol Infect*, 20(4), O207-215.
- Lee, D. G., Urbach, J. M., Wu, G., Liberati, N. T., Feinbaum, R. L., Miyata, S., Diggins, L. T., He, J., Saucier, M., Deziel, E., Friedman, L., Li, L., Grills, G., Montgomery, K., Kucherlapati, R., Rahme, L. G., Ausubel, F. M. (2006).** Genomic analysis reveals that *Pseudomonas aeruginosa* virulence is combinatorial. *Genome Biol*, 7(10), R90.
- Lefebvre, M., Valvano, M. (2001).** In vitro resistance of *Burkholderia cepacia* complex isolates to reactive oxygen species in relation to catalase and superoxide dismutase production. *Microbiology*, 147(Pt 1), 97-109.
- Levy, I., Grisaru-Soen, G., Lerner-Geva, L., Kerem, E., Blau, H., Bentur, L., Aviram, M., Rivlin, J., Picard, E., Lavy, A., Yahav, Y., Rahav, G. (2008).** Multicenter cross-sectional study of nontuberculous mycobacterial infections among cystic fibrosis patients, Israel. *Emerg Infect Dis*, 14(3), 378-384.
- Li, W., Raoult, D., Fournier, P. E. (2009).** Bacterial strain typing in the genomic era. *FEMS Microbiol Rev*, 33(5), 892-916.
- Libish, B., Watine, J., Balogh, B., Gacs, M., Muzslay, M., Szabó, G., Fuzi, M. (2008).** Molecular typing indicates an important role for two international clonal complexes in dissemination of VIM - producing *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates in Hungary. *Res. Microbiol.* 159, 162-168.
- Lyczak, J. B., Cannon, C. L., Pier, G. B. (2002).** Lung infections associated with cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev*, 15(2), 194-222.

- Mackie, A. D., Thornton, S. J., Edenborough, F. P. (2003).** Cystic fibrosis-related diabetes. *Diabet Med*, 20(6), 425-436.
- Mahenthiralingam, E., Baldwin, A., Dowson, C. G. (2008).** *Burkholderia cepacia* complex bacteria: opportunistic pathogens with important natural biology. *J Appl Microbiol*, 104(6), 1539-1551.
- Mahenthiralingam, E., Bischof, J., Byrne, S. K., Radomski, C., Davies, J. E., Av-Gay, Y., Vandamme, P. (2000).** DNA-Based diagnostic approaches for identification of *Burkholderia cepacia* complex, *Burkholderia vietnamiensis*, *Burkholderia multivorans*, *Burkholderia stabilis*, and *Burkholderia cepacia* genomovars I and III. *J Clin Microbiol*, 38(9), 3165-3173.
- Mahenthiralingam, E., Campbell, M. E., Foster, J., Lam, J. S., Speert, D. P. (1996).** Random amplified polymorphic DNA typing of *Pseudomonas aeruginosa* isolates recovered from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol*, 34(5), 1129-1135.
- Mahenthiralingam, E., Simpson, D. A., Speert, D. P. (1997).** Identification and characterization of a novel DNA marker associated with epidemic *Burkholderia cepacia* strains recovered from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol*, 35(4), 808-816.
- Mahenthiralingam, E., Urban, T. A., Goldberg, J. B. (2005).** The multifarious, multireplicon *Burkholderia cepacia* complex. *Nat Rev Microbiol*, 3(2), 144-156.
- Mahenthiralingam, E., Vandamme, P. (2005).** Taxonomy and pathogenesis of the *Burkholderia cepacia* complex. *Chron Respir Dis*, 2(4), 209-217.
- Maiden, M. C., Bygraves, J. A., Feil, E., Morelli, G., Russell, J. E., Urwin, R., Zhang, Q., Zhou, J., Zurth, K., Caugant, D. A., Feavers, I. M., Achtman, M., Spratt, B. G. (1998).** Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(6), 3140-3145.
- Martin, D. W., Schurr, M. J., Mudd, M. H., Govan, J. R., Holloway, B. W., Deretic, V. (1993).** Mechanism of conversion to mucoidy in *Pseudomonas aeruginosa* infecting cystic fibrosis patients. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(18), 8377-8381.
- Martina, P., Bettioli, M., Vescina, C., Montanaro, P., Mannino, M. C., Prieto, C. I., Vay, C., Naumann, D., Schmitt, J., Yantorno, O., Lagares, A., Bosch, A. (2013).** Genetic diversity of *Burkholderia contaminans* isolates from cystic fibrosis patients in Argentina. *J Clin Microbiol*, 51(1), 339-344.
- Matloob, M., Griffiths, M. (2014).** Ribotyping and Automated Ribotyping of *Listeria monocytogenes*. *Methods Mol Biol*, 1157, 85-93.
- Matsui, H., Grubb, B. R., Tarran, R., Randell, S. H., Gatzky, J. T., Davis, C. W., Boucher, R. C. (1998).** Evidence for periciliary liquid layer depletion, not abnormal ion composition, in the pathogenesis of cystic fibrosis airways disease. *Cell*, 95(7), 1005-1015.

- McLoughlin, T. J., Quinn, J. P., Bettermann, A., Bookland, R. (1992).** Pseudomonas cepacia suppression of sunflower wilt fungus and role of antifungal compounds in controlling the disease. *Appl Environ Microbiol*, 58(5), 1760-1763.
- Medina-Pascual, M. J., Valdezate, S., Villalon, P., Garrido, N., Rubio, V., Saez-Nieto, J. A. (2012).** Identification, molecular characterisation and antimicrobial susceptibility of genomovars of the *Burkholderia cepacia* complex in Spain. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 31(12), 3385-3396.
- Mena, A., Smith, E. E., Burns, J. L., Speert, D. P., Moskowitz, S. M., Perez, J. L., Oliver, A. (2008).** Genetic adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to the airways of cystic fibrosis patients is catalyzed by hypermutation. *J Bacteriol*, 190(24), 7910-7917.
- Miche, L., Faure, D., Blot, M., Cabanne-Giuli, E., Balandreau, J. (2001).** Detection and activity of insertion sequences in environmental strains of *Burkholderia*. *Environ Microbiol*, 3(12), 766-773.
- Miller, M. B., Gilligan, P. H. (2003).** Laboratory aspects of management of chronic pulmonary infections in patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol*, 41(9), 4009-4015.
- Mokrousov, I., Vyazovaya, A., Kolodkina, V., Limeschenko, E., Titov, L., Narvskaya, O. (2009).** Novel macroarray-based method of *Corynebacterium diphtheriae* genotyping: evaluation in a field study in Belarus. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 28(6), 701-703.
- Morris, D., Fallon, L., Heaf, L., Burrows, E., Wallace, H., McNamara, P., Winstanley, C., Southern, K.W. (2009).** A reducing prevalence of the Liverpool epidemic strain of *Pseudomonas aeruginosa* in children attending the index paediatric clinic. *Pediatr Pulmonol*, 325 - 325.
- Mowat, E., Paterson, S., Fothergill, J. L., Wright, E. A., Ledson, M. J., Walshaw, M. J., Brockhurst, M. A., Winstanley, C. (2011).** *Pseudomonas aeruginosa* population diversity and turnover in cystic fibrosis chronic infections. *Am J Respir Crit Care Med*, 183(12), 1674-1679.
- Murray, T. S., Egan, M., Kazmierczak, B. I. (2007).** *Pseudomonas aeruginosa* chronic colonization in cystic fibrosis patients. *Curr Opin Pediatr*, 19(1), 83-88.
- Nemec, A., Krizova, L., Maixnerova, M., Diancourt, L., van der Reijden, T. J., Brisse, S., van den Broek, P., Dijkshoorn, L. (2008).** Emergence of carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii* in the Czech Republic is associated with the spread of multidrug-resistant strains of European clone II. *J Antimicrob Chemother*, 62(3), 484-489.
- Nemec A., Krizova L., Maixnerova M., Musilek M. (2010).** Multidrug-resistant epidemic clones among bloodstream isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in the Czech Republic. *Res Microbiol*. 161(3):234-42.

- Northey, G., Gal, M., Rahmati, A., Brazier, J. S. (2005).** Subtyping of *Clostridium difficile* PCR ribotype 001 by REP-PCR and PFGE. *J Med Microbiol*, 54(Pt 6), 543-547.
- O'Carroll, M. R., Syrmis, M. W., Wainwright, C. E., Greer, R. M., Mitchell, P., Coulter, C., Sloots, T. P., Nissen, M. D., Bell, S. C. (2004).** Clonal strains of *Pseudomonas aeruginosa* in paediatric and adult cystic fibrosis units. *Eur Respir J*, 24(1), 101-106.
- Ohtsubo, Y., Genka, H., Komatsu, H., Nagata, Y., Tsuda, M. (2005).** High-temperature-induced transposition of insertion elements in *Burkholderia multivorans* ATCC 17616. *Appl Environ Microbiol*, 71(4), 1822-1828.
- Ojeniyi, B., Frederiksen, B., Hoiby, N. (2000).** *Pseudomonas aeruginosa* cross-infection among patients with cystic fibrosis during a winter camp. *Pediatr Pulmonol*, 29(3), 177-181.
- Panagea, S., Winstanley, C., Parsons, Y. N., Walshaw, M. J., Ledson, M. J., Hart, C. A. (2003).** PCR-based detection of a cystic fibrosis epidemic strain of *Pseudomonas Aeruginosa*. *Mol Diagn*, 7(3-4), 195-200.
- Pedersen, S. S., Hoiby, N., Espersen, F., Koch, C. (1992).** Role of alginate in infection with mucoid *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. *Thorax*, 47(1), 6-13.
- Pedersen, S. S., Koch, C., Hoiby, N., Rosendal, K. (1986).** An epidemic spread of multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* in a cystic fibrosis centre. *J Antimicrob Chemother*, 17(4), 505-516.
- Peeters, E., Sass, A. M., Mahenthiralingam, E., Nelis, H., Coenye, T. (2010).** Transcriptional response of *Burkholderia cenocepacia* J2315 sessile cells to treatments with high doses of hydrogen peroxide and sodium hypochlorite. *BMC Genomics*. 5;11:90.
- Peeters C., Zlosnik J.E., Spilker T., Hird T.J., LiPuma J.J., Vandamme P. (2013).** *Burkholderia pseudomultivorans* sp. nov., a novel *Burkholderia cepacia* complex species from human respiratory samples and the rhizosphere. *Syst Appl Microbiol*. 36(7), 483-9.
- Romling, U., Kader, A., Sriramulu, D. D., Simm, R., Kronvall, G. (2005).** Worldwide distribution of *Pseudomonas aeruginosa* clone C strains in the aquatic environment and cystic fibrosis patients. *Environ Microbiol*, 7(7), 1029-1038.
- Ronaghi, M., Uhlen, M., Nyren, P. (1998).** A sequencing method based on real-time pyrophosphate. *Science*, 281(5375), 363, 365.
- Roomans, G. M. (2014).** Pharmacologic treatment of the basic defect in cystic fibrosis. *Cell Biol Int*.
- Sass, A. M., Schmerk, C., Agnoli, K., Norville, P. J., Eberl, L., Valvano, M. A., Mahenthiralingam, E. (2013).** The unexpected discovery of a novel low-oxygen-activated locus for the anoxic persistence of *Burkholderia cenocepacia*. *The ISME Journal* 7, 1568 – 158.

- Sajjan, U. S., Sun, L., Goldstein, R., Forstner, J. F. (1995).** Cable (cbl) type II pili of cystic fibrosis-associated *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia*: nucleotide sequence of the cblA major subunit pilin gene and novel morphology of the assembled appendage fibers. *J Bacteriol*, 177(4), 1030-1038.
- Saulnier, P., Bourneix, C., Prevost, G., Andremont, A. (1993).** Random amplified polymorphic DNA assay is less discriminant than pulsed-field gel electrophoresis for typing strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol*, 31(4), 982-985.
- Scordilis, G. E., Ree, H., Lessie, T. G. (1987).** Identification of transposable elements which activate gene expression in *Pseudomonas cepacia*. *J Bacteriol*, 169(1), 8-13.
- Scott, F. W., Pitt, T. L. (2004).** Identification and characterization of transmissible *Pseudomonas aeruginosa* strains in cystic fibrosis patients in England and Wales. *J Med Microbiol*, 53(Pt 7), 609-615.
- Sibley, C. D., Rabin, H., Surette, M. G. (2006).** Cystic fibrosis: a polymicrobial infectious disease. *Future Microbiol*, 1(1), 53-61.
- Silby, M. W., Winstanley, C., Godfrey, S. A., Levy, S. B., Jackson, R. W. (2011).** *Pseudomonas* genomes: diverse and adaptable. *FEMS Microbiol Rev*, 35(4), 652-680.
- Smart, C. H., Scott, F. W., Wright, E. A., Walshaw, M. J., Hart, C. A., Pitt, T. L., Winstanley, C. (2006).** Development of a diagnostic test for the Midlands 1 cystic fibrosis epidemic strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Med Microbiol*, 55(Pt 8), 1085-1091.
- Speert, D. P., Henry, D., Vandamme, P., Corey, M., Mahenthiralingam, E. (2002).** Epidemiology of *Burkholderia cepacia* complex in patients with cystic fibrosis, Canada. *Emerg Infect Dis*, 8(2), 181-187.
- Spencer, D. H., Kas, A., Smith, E. E., Raymond, C. K., Sims, E. H., Hastings, M., Burns, J. L., Kaul, R., Olson, M. V. (2003).** Whole-genome sequence variation among multiple isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*, 185(4), 1316-1325.
- Spilker, T., Baldwin, A., Bumford, A., Dowson, C. G., Mahenthiralingam, E., LiPuma, J. J. (2009).** Expanded multilocus sequence typing for *Burkholderia* species. *J Clin Microbiol*, 47(8), 2607-2610.
- Stover, C. K., Pham, X. Q., Erwin, A. L., Mizoguchi, S. D., Warrener, P., Hickey, M. J., Brinkman, F. S., Hufnagle, W. O., Kowalik, D. J., Lagrou, M., Garber, R. L., Goltry, L., Tolentino, E., Westbrook-Wadman, S., Yuan, Y., Brody, L. L., Coulter, S. N., Folger, K. R., Kas, A., Larbig, K., Lim, R., Smith, K., Spencer, D., Wong, G. K., Wu, Z., Paulsen, I. T., Reizer, J., Saier, M. H., Hancock, R. E., Lory, S., Olson, M. V. (2000).** Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature*, 406(6799), 959-964.

- Taneja, N., Sangar, G., Chowdhury, G., Ramamurthy, T., Mishra, A., Singh, M., Sharma, M. (2012).** Molecular epidemiology of *Vibrio cholerae* causing outbreaks & sporadic cholera in northern India. *Indian J Med Res*, 136(4), 656-663.
- Tenover, F. C., Arbeit, R. D., Goering, R. V., Mickelsen, P. A., Murray, B. E., Persing, D. H., Swaminathan, B. (1995).** Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol*, 33(9), 2233-2239.
- Trad, S., Allignet, J., Frangeul, L., Davi, M., Vergassola, M., Couve, E., Morvan, A., Kechrid, A., Buchrieser, C., Glaser, P., El-Solh, N. (2004).** DNA macroarray for identification and typing of *Staphylococcus aureus* isolates. *J Clin Microbiol*, 42(5), 2054-2064.
- Tsen, H. Y., Lin, J. S., Hsih, H. Y. (2002).** Pulsed field gel electrophoresis for animal *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolates in Taiwan. *Vet Microbiol*, 87(1), 73-80.
- Twomey, K. B., Alston, M., An, S. Q., O'Connell, O. J., McCarthy, Y., Swarbreck, D., Febrer, M., Dow, J. M., Plant, B. J., Ryan, R. P. (2013).** Microbiota and metabolite profiling reveal specific alterations in bacterial community structure and environment in the cystic fibrosis airway during exacerbation. *PLoS One*, 8(12), e82432.
- Uehlinger, S., Schwager, S., Bernier, S. P., Riedel, K., Nguyen, D. T., Sokol, P. A., Eberl, L. (2009).** Identification of specific and universal virulence factors in *Burkholderia cenocepacia* strains by using multiple infection hosts. *Infect Immun*, 77(9), 4102-4110.
- Valdezate, S., Vindel, A., Martin-Davila, P., Del Saz, B. S., Baquero, F., Canton, R. (2004).** High genetic diversity among *Stenotrophomonas maltophilia* strains despite their originating at a single hospital. *J Clin Microbiol*, 42(2), 693-699.
- Van Acker, H., Sass, A., Bazzini, S., De Roy, K., Udine, C., Messiaen, T., Riccardi, G., Boon, N., Nelis, H.J., Mahenthiralingam, E., Coenye, T. (2013).** Biofilm-Grown *Burkholderia cepacia* Complex Cells Survive Antibiotic Treatment by Avoiding Production of Reactive Oxygen Species. *PLoS One*. 2013; 8(3): e58943.
- van Belkum A., Tassios, P. T., Dijkshoorn L., Haeggman S., Cookson B., Fry N. K., Fussing V., Green J., Feil, E., Gerner-Smidt P., Brisse S. and Struelens M. (2007).** Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. *Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 13(3), 1-46.
- Van Daele, S., Vanechoutte, M., De Boeck, K., Knoop, C., Malfroot, A., Lebecque, P., Leclercq-Foucart, J., Van Schil, L., Desager, K., De Baets, F. (2006).** Survey of *Pseudomonas aeruginosa* genotypes in colonised cystic fibrosis patients. *Eur Respir J*, 28(4), 740-747.
- Van Daele, S. G., Franckx, H., Verhelst, R., Schelstraete, P., Haerynck, F., Van Simaey, L., Claeys, G., Vanechoutte, M., de Baets, F. (2005).** Epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* in a cystic fibrosis rehabilitation centre. *Eur Respir J*, 25(3), 474-481.

- Vandamme, P., Dawyndt, P. (2011).** Classification and identification of the *Burkholderia cepacia* complex: Past, present and future. *Syst Appl Microbiol*, 34(2), 87-95.
- Vandamme, P., Henry, D., Coenye, T., Nzula, S., Vancanneyt, M., LiPuma, J. J., Speert, D. P., Govan, J. R., Mahenthiralingam, E. (2002).** *Burkholderia anthina* sp. nov. and *Burkholderia pyrrocinia*, two additional *Burkholderia cepacia* complex bacteria, may confound results of new molecular diagnostic tools. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 33(2), 143-149.
- Vandamme, P., Holmes, B., Coenye, T., Goris, J., Mahenthiralingam, E., LiPuma, J. J., Govan, J. R. (2003).** *Burkholderia cenocepacia* sp. nov.--a new twist to an old story. *Res Microbiol*, 154(2), 91-96.
- Vandamme, P., Holmes, B., Vancanneyt, M., Coenye, T., Hoste, B., Coopman, R., Revets, H., Lauwers, S., Gillis, M., Kersters, K., Govan, J. R. (1997).** Occurrence of multiple genomovars of *Burkholderia cepacia* in cystic fibrosis patients and proposal of *Burkholderia multivorans* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol*, 47(4), 1188-1200.
- Vandamme, P., Mahenthiralingam, E., Holmes, B., Coenye, T., Hoste, B., De Vos, P., Henry, D., Speert, D. P. (2000).** Identification and population structure of *Burkholderia stabilis* sp. nov. (formerly *Burkholderia cepacia* genomovar IV). *J Clin Microbiol*, 38(3), 1042-1047.
- Vanlaere, E., Baldwin, A., Gevers, D., Henry, D., De Brandt, E., LiPuma, J. J., Mahenthiralingam, E., Speert, D. P., Dowson, C., Vandamme, P. (2009).** Taxon K, a complex within the *Burkholderia cepacia* complex, comprises at least two novel species, *Burkholderia contaminans* sp. nov. and *Burkholderia lata* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*, 59(Pt 1), 102-111.
- Vanlaere, E., Lipuma, J. J., Baldwin, A., Henry, D., De Brandt, E., Mahenthiralingam, E., Speert, D., Dowson, C., Vandamme, P. (2008).** *Burkholderia latens* sp. nov., *Burkholderia diffusa* sp. nov., *Burkholderia arboris* sp. nov., *Burkholderia seminalis* sp. nov. and *Burkholderia metallica* sp. nov., novel species within the *Burkholderia cepacia* complex. *Int J Syst Evol Microbiol*, 58(Pt 7), 1580-1590.
- Vávrová V a kolektiv. (2006).** Cystická fibróza. *Monografie, Grada*.
- Vermis, K., Coenye, T., LiPuma, J. J., Mahenthiralingam, E., Nelis, H. J., Vandamme, P. (2004).** Proposal to accommodate *Burkholderia cepacia* genomovar VI as *Burkholderia dolosa* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*, 54(Pt 3), 689-691.
- Versalovic, J., Koeuth, T., Lupski, J. R. (1991).** Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res*, 19(24), 6823-6831.
- Vimont, S., Mnif, B., Fevre, C., Brisse, S. (2008).** Comparison of PFGE and multilocus sequence typing for analysis of *Klebsiella pneumoniae* isolates. *J Med Microbiol*, 57(Pt 10), 1308-1310.

- Waine, D. J., Henry, D. A., Baldwin, A., Speert, D. P., Honeybourne, D., Mahenthiralingam, E., Dowson, C. G. (2007).** Reliability of multilocus sequence typing of the *Burkholderia cepacia* complex in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros*, 6(3), 215-219.
- Viedma, E., Juan, C., Acosta, J., Zamorano, L., Otero, J.R., Sanz, F., Chaves, F., Oliver, A. (2009).** Nosocomial spread of colistin-only-sensitive sequence type 235 *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing the extended-spectrum beta-lactamases GES-1 and GES-5 in Spain. *Antimicrob Agents Chemother*. 53(11):4930 - 3.
- Wiehlmann, L., Munder, A., Adams, T., Juhas, M., Kolmar, H., Salunkhe, P., Tummler, B. (2007).** Functional genomics of *Pseudomonas aeruginosa* to identify habitat-specific determinants of pathogenicity. *Int J Med Microbiol*, 297(7-8), 615-623.
- Wood, M. S., Byrne, A., Lessie, T. G. (1991).** IS406 and IS407, two gene-activating insertion sequences for *Pseudomonas cepacia*. *Gene*, 105(1), 101-105.
- Workentine, M. L., Sibley, C. D., Glezerson, B., Purighalla, S., Norgaard-Gron, J. C., Parkins, M. D., Rabin, H. R., Surette, M. G. (2013).** Phenotypic heterogeneity of *Pseudomonas aeruginosa* populations in a cystic fibrosis patient. *PLoS One*, 8(4), e60225.
- Yang, J. H., Spilker, T., LiPuma, J. J. (2006).** Simultaneous coinfection by multiple strains during *Burkholderia cepacia* complex infection in cystic fibrosis. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 54(2), 95-98.
- Zaczek, A., Ziolkiewicz, M., Wojtasik, A., Dziadek, J., Sajduda, A. (2013).** IS6110-based differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* strains. *Pol J Microbiol*, 62(2), 201-204.

10. PŘÍLOHY

10.1. Příloha č. 1

High genotypic diversity of *Pseudomonas aeruginosa* strains from patients with cystic fibrosis in the Czech Republic.

Vosahlikova S., Drevinek P., Cinek O., Pohunek P., Maixnerova M., Urbaskova P., van den Reijden T. J. K., Dijkshoon L., Nemecek A. *Research in Microbiology* 158 (2007) 324–329.



High genotypic diversity of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from patients with cystic fibrosis in the Czech Republic

Sarka Vosahlikova^a, Pavel Drevinek^a, Ondrej Cinek^a, Petr Pohunek^a, Martina Maixnerova^b, Pavla Urbaskova^b, Tanny J.K. van den Reijden^c, Lenie Dijkshoorn^c, Alexandr Nemeč^{b,*}

^a Department of Paediatrics, 2nd Medical School, Charles University in Prague, Úvalu 84, 15006 Prague 5, Czech Republic

^b Centre of Epidemiology and Microbiology, National Institute of Public Health, Šrobárova 48, 10042 Prague, Czech Republic

^c Department of Infectious Diseases, Leiden University Medical Center, C5-P, P.O. Box 9600, 2300 RC Leiden, The Netherlands

Received 1 November 2006; accepted 11 February 2007

Available online 3 March 2007

Abstract

Over the last decade, epidemic and frequently multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* has increasingly been found among European cystic fibrosis (CF) patients. In the Czech Republic, more than half of the registered CF patients attend the Prague CF centre. At this centre, a Burkholderia cenocepacia strain was recently found to have spread among the patients. The aim of the present study was to assess whether *P. aeruginosa* isolates from patients at this centre were also genetically related and, if so, whether they were multidrug-resistant. We investigated a collection of 69 isolates from as many patients who represented 80% of the total number of *P. aeruginosa*-positive patients in 2004. The organisms were typed by AFLP and SpeI macrorestriction analyses (PFGE). Using these methods, 44 unique strains and nine groups of two to five isolates each were distinguished. Among these groups, two each had a prevalence of 7% in the patient population, while others had a prevalence of $\leq 3\%$. The diversity observed with PFGE was largely in agreement with the diversity found by AFLP analysis. All isolates were susceptible to colistin; 94e 96% were susceptible to piperacillin, ceftazidime, cefepime, meropenem, amikacin or tobramycin; and 84e 87% were susceptible to ciprofloxacin, gentamicin or netilmicin. In conclusion, the organisms recovered from Czech CF patients showed high genotypic diversity and good susceptibility to antipseudomonal agents. The absence of highly epidemic *P. aeruginosa* strains may result from infection control measures taken upon recognition of the epidemic *B. cenocepacia*.

© 2007 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*; Cystic fibrosis; Genetic diversity

1. Introduction

Pseudomonas aeruginosa, a ubiquitous Gram-negative bacterium, is an opportunistic pathogen in humans with cystic fibrosis (CF). Chronic infection of the respiratory tract with *P. aeruginosa* has been described in up to 80% of adult CF patients and is known to be associated with clinical deterioration

and subsequently with increased morbidity and mortality [4,11,12].

Until recently, CF patients were thought to harbour their own unique *P. aeruginosa* strains acquired from the natural environment. Cross-infection was considered a relatively infrequent source of acquisition. However, over the last decade, the emergence of epidemic strains has been reported with increasing frequency. In the UK, one epidemic strain was found in 59% of *P. aeruginosa*-positive children at the Liverpool Paediatric Clinic [2]. Another strain, the Midlands 1 epidemic strain, was detected in 10% of *P. aeruginosa*-positive patients in England and Wales [16]. A Norwegian study showed that

* Corresponding author. Tel.: +420 267082266.

E-mail address: anemec@szu.cz (A. Nemeč).

45% of *P. aeruginosa*-positive CF patients harboured genotypically indistinguishable isolates [10]. Similarly, 55% of CF patients in Melbourne, Australia, carried a common epidemic strain [1]. Recently, Romling and co-workers [15] have reported the spread of an epidemic clone (clone C) that had disseminated over several countries on two continents.

There is a general agreement on the need for segregation between CF patients infected with *P. aeruginosa* and those free of this infection. This is to prevent transmission, although the efficacy of these practices is as yet unproven [9]. If patients with highly transmissible strains were to be segregated from those with sporadic strains, this would even further complicate infection control policy.

In a recent study, an epidemic strain of *Burkholderia cenocepacia* was found to have spread widely within the Czech CF population [8]. Despite the occurrence of *P. aeruginosa* among Czech CF patients, the possible epidemiological relatedness of these organisms has not yet been investigated using molecular methods. The aim of the present study was therefore to assess the genotypic relatedness of *P. aeruginosa* strains from Czech patients with CF. Representative isolates from the Prague CF centre were analysed by two high-resolution DNA fingerprinting methods and tested for antibiotic susceptibility. In addition, epidemiological data were evaluated to track possible routes of *P. aeruginosa* transmission among infected patients.

2. Materials and methods

2.1. Prague CF centre

In the Czech Republic, care for patients with CF is confined to four CF centres. The present study was performed at the Prague CF centre, the largest in the country. In the beginning of 2004, this centre took care of 264 (61%) out of 430 patients with known CF in the Czech Republic.

2.2. Anti-epidemic measures

The segregation of patients according to their microbiological status was implemented at the Prague centre starting in January 1998 as a response to the increasing number of patients positive for the *B. cepacia* complex. This included separation of patients in outpatient and inpatient CF departments into three groups: (1) patients positive for *P. aeruginosa*, (2) patients positive for *B. cepacia* complex, and (3) patients infected with neither. Patients were seen on separate days and in different suites at the CF clinic. If admitted, they were allocated to one of three different wards distinguished according to patients' microbiological status and situated in different parts of the hospital. As part of the segregation measures, all social activities including summer camps and patient education meetings ceased in 1998. Since 2001, when a PCR-based method detecting the most prevalent genomovars of the *B. cepacia* complex was introduced at the centre [7], segregation has been refined by splitting group 2 into patients with *B. cenocepacia* and those infected with other genomovars of the

B. cepacia complex. Standard hygiene precautions summarized in consensus documents of the UK Cystic Fibrosis Trust form an integral part of the local infection control policy [20,21].

2.3. Bacterial isolates, species identification and antibiotic susceptibility testing

In 2004, 225 out of 264 patients attending the Prague CF centre were able to provide sputum samples. Eighty-six of them (38%) repeatedly had a positive culture for *P. aeruginosa* from sputum, suggesting chronic infection with this bacterium. A total of 69 isolates, each from a different patient, were included in the present study (no isolates from the remaining 17 *P. aeruginosa*-positive patients were available). The isolates were from 28 males and 41 females with a median age of 15.7 years and an interquartile range of 8–22 years, all from the paediatric service of the CF centre. Each isolate originated from a single colony of each patient's culture and was identified as *P. aeruginosa* by API20NE (bioMérieux, Lyon, France) and by species-specific PCR targeting the *optL* gene [5]. Furthermore, 19 additional isolates from as many patients randomly selected from the 69 patients were analysed. In every patient, the second isolate was collected within a period of two to seven months after the first isolate. The minimal inhibitory concentrations of 10 antimicrobial agents were determined by the microdilution method according to the guidelines of the CLSI [3], formerly NCCLS.

2.4. AFLP analysis

Genotypic relatedness of isolates was assessed using AFLP™, a DNA fingerprinting method based on selective amplification of restriction fragments [13]. In brief, purified DNA was digested using *EcoRI* and *MseI* and *EcoRI* and *MseI* adapters were ligated to the resulting restriction fragments. PCR was done with a Cy5-labelled *EcoRI* primer (no selective nucleotide added) and a *MseI* + C primer (C, selective nucleotide). The ALF express system (Amersham Biosciences, Roosendaal, The Netherlands) was used for fragment separation and automated data capturing. Fragments of 50–500 bp were subjected to cluster analysis using BioNumerics software release 4.6 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium) with Pearson product moment coefficient (*r*) as a measure of similarity, and the unweighted pair group method using arithmetic averages (UPGMA) for grouping. The optimization setting was 0.5%, and the region for cluster analysis was 7.0–95.2% of the profile.

2.5. Macrorestriction analysis

Genotypic similarity of isolates was also analysed using *SpeI* (New England Biolabs, Herts, UK) macrorestriction by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) of restriction fragments. Bacterial cultures were grown on tryptone soya agar (TSA) at 30 °C overnight, then subcultured on TSA and incubated at 30 °C for 24 h. After standardization of the cell

suspension by optical density measurement, cells were embedded in low gelling temperature agarose (Agarose Type VII; Sigma, St. Louis, MO, USA). The resulting plugs were lysed in 1 ml of solution containing 1 M Tris pH 8.0, 1 M NaCl, 0.5 M EDTA, 0.2% (w/v) sodium deoxycholate (Sigma), 0.5% (w/v) sodium *N*-lauroyl sarcosine (Sigma) and 1 mg of lysozyme (Sigma) at 37 °C for 5 h, and then lysed in 1 ml of solution containing 0.5 M EDTA, 1% (w/v) *N*-lauroyl sarcosine and 1 mg of proteinase K (Sigma) at 65 °C overnight. The plugs were then washed five times in Tris pH 8.0, 0.5 M EDTA, while agitated at 120 rpm for 30 min at room temperature. The plugs were digested with *Spe*I (30 U per plug) for 24 h at 37 °C. Restriction fragments of DNA were separated with a CHEF-DRIII device (Bio-Rad, Hercules, USA) through a 1.2% SeaKem LE agarose gel (Cambrex, Rockland, USA) in 0.5× Tris–borate EDTA running buffer at 14 °C for 20 h. The pulse times were 5–35 s at 6 V/cm. A lambda ladder (Bio-Rad) was used as a size marker. After electrophoresis, gels were stained with ethidium bromide and photographed under UV light. The resulting fingerprints were compared visually.

2.6. Tracking of contacts among patients

To verify whether strains found in different patients may have been transmitted by patient-to-patient contact inside the CF centre, we tracked potential contacts among *P. aeruginosa*-infected patients at the hospital. This tracking was done using data from the hospital information system that contains details on the diagnostic or therapeutic procedures of patients, including the date and the place where procedures were carried out. Tracking was performed using data covering a period of four years (2000–2003) before collection of sputum samples for the present study. Using all 10,234 records from patients included in the molecular study, we created a three-dimensional matrix in which one dimension was time (date), the second was place (identified by a numeric code for one of 216 units, wards and clinics where the patients were receiving care), and the third dimension identified the patient. Using this system, all possible contacts among patients sharing isolates with common fingerprints were tracked in time and space.

3. Results and discussion

3.1. Genotypic diversity

Genotypic relatedness of isolates was assessed by AFLP and macrorestriction analysis. AFLP had first been validated for reproducibility using multiple samples of the same strain and for epidemiologic concordance using multiple isolates from several patients. It was concluded that the method permitted both the distinguishing of unrelated strains and identification of genetically (and thus possibly epidemiologically) related isolates at a clustering level of $\geq 85\%$ (data not shown).

Results of AFLP analysis of Czech isolates are shown in Fig. 1. Overall, a high diversity was observed. At the cluster

delineation level of 85%, 44 unique AFLP patterns and nine well separated clusters, numbered 1–9, were distinguished. The AFLP clusters designated 1, 2 and 3 comprised five, five and three isolates, respectively, while pairs of isolates with similar AFLP patterns formed the remaining six clusters. All these clusters were linked to each other or to unique patterns below a level of 80%. Thus, the highest rate of patients carrying strains with the same profile was 7% (cluster 1 or 2), while for other common profiles the rates were 3% or less.

In addition to AFLP analysis, 64 isolates were analysed by PFGE (five isolates were not tested due to technical problems). The PFGE patterns showed a high degree of heterogeneity: the vast majority of PFGE patterns differed from each other in more than six band positions (Fig. 2). On the other hand, isolates that clustered together in the AFLP dendrogram also had highly similar PFGE patterns or showed a common motif in their PFGE patterns. For example, three isolates of AFLP cluster 3 showed only minor differences in their PFGE patterns. Similarly, minor changes were observed in some isolates of clusters 2 and 1 (Fig. 2). Such relatively small differences may occur in genotypically (clonally) highly related strains and may reflect relatively recent structural changes in their genome [6].

In the present study, an isolate originating from a single colony was used to represent the *P. aeruginosa* population of a patient. However, it has been recently shown that CF patients may carry two or more genotypes of *P. aeruginosa* [22,23]. To check to what extent we might have overlooked the presence of multiple genotypes in the same patient, we analysed 19 additional isolates from as many patients. Fifteen isolates showed a PFGE pattern indistinguishable or highly similar to their first respective isolate each. Four remaining isolates had patterns completely different from those of the first respective isolates and these patterns differed from each other as well as from patterns found among the other isolates of the study. Even though it is not clear whether the heterogeneity of genotypes found in each of the four patients resulted from co-infection with two strains or from replacement of one strain by another, these results support our finding of the generally high diversity of the *P. aeruginosa* population studied.

Although the observed high similarity of AFLP and PFGE patterns of some isolates may reflect accidental cross-infection events, the prevalence of the cluster genotypes (strains) was significantly lower than that of the epidemic strains found in other centres [1,10,16]. Overall, there were no indications of wide spread of a predominant epidemic strain among Czech CF patients. Our results are thus similar to those reported by centres in Vancouver and British Columbia (Canada), Porto Alegre (Brasil) and Staffordshire (UK), which detected only a limited degree of relatedness among strains [17–19].

3.2. Antibiotic susceptibility

The percentages of isolates susceptible to the tested agents were as follows: colistin (100), piperacillin (96), cefepime (96), ceftazidime (94), meropenem (96), tobramycin (96), amikacin (96), netilmicin (87), gentamicin (86), and ciprofloxacin (84). Fifty-two isolates (75%) were susceptible to all

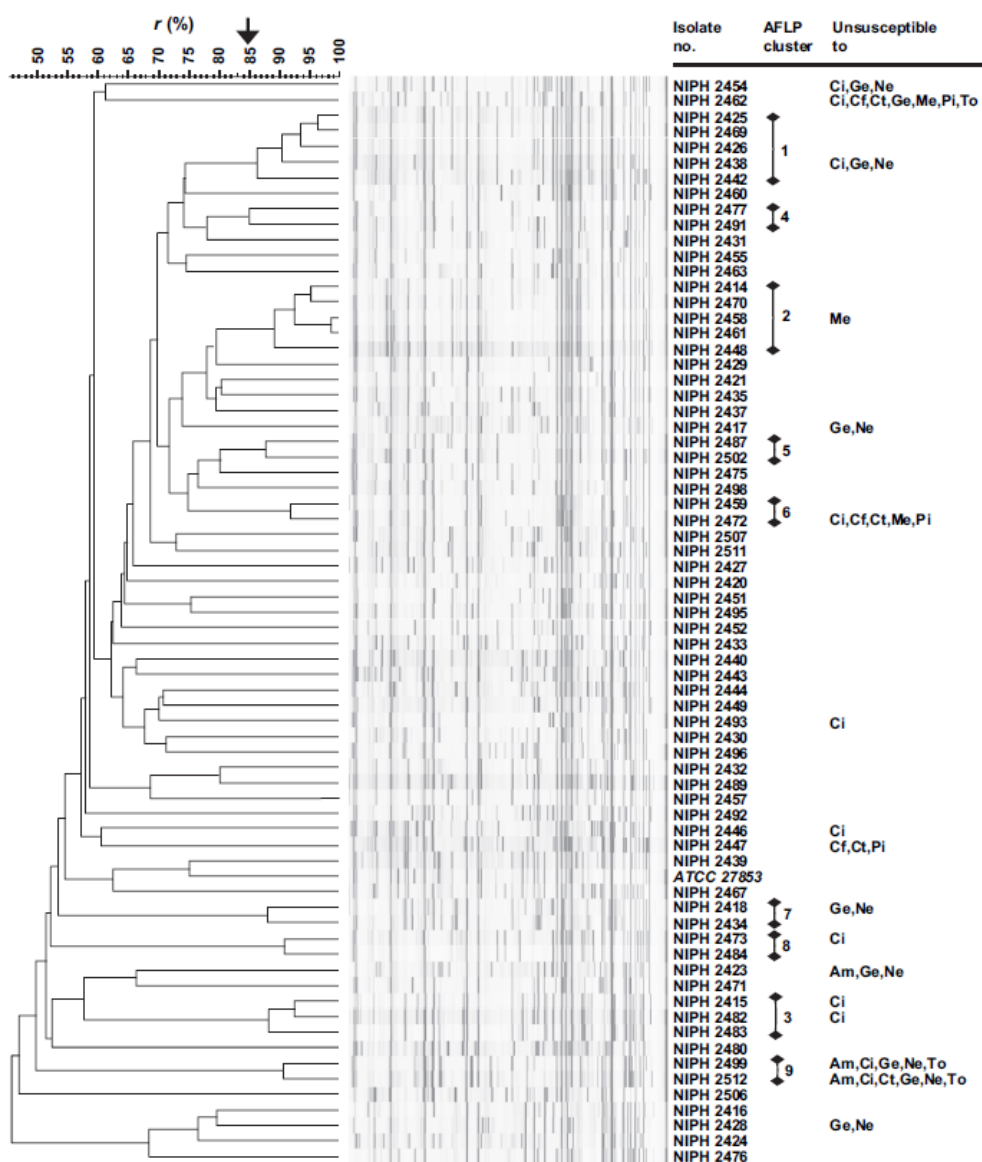


Fig. 1. Dendrogram of cluster analysis of AFLP fingerprints of 69 isolates from *P. aeruginosa* from Czech patients with cystic fibrosis. Indicated are clusters of isolates defined at a level of $\geq 85\%$. ATCC 27853, a reference *P. aeruginosa* strain. Abbreviations for antibiotics: Am, amikacin; Ci, ciprofloxacin; Cf, cefepime; Ct, ceftazidime; Ge, gentamicin; Me, meropenem; Ne, netilmicin; Pi, piperacillin; and To, tobramycin.

antimicrobial agents, while 13 isolates were resistant or intermediately susceptible to one to three agents, and four isolates were resistant or intermediately susceptible to five to seven agents (Fig. 1). Only seven isolates were resistant to more than one antimicrobial class. AFLP clusters comprised either fully susceptible isolates or isolates with heterogeneous resistance profiles (Fig. 1). Overall, isolates showed good susceptibility to antipseudomonal agents, in contrast with the noted

multidrug resistance of epidemic strains found in some European centres [2,14].

3.3. Contacts among patients with genotypically related isolates

Several sets of isolates from 25 different patients showed highly similar genotypes which might have resulted from

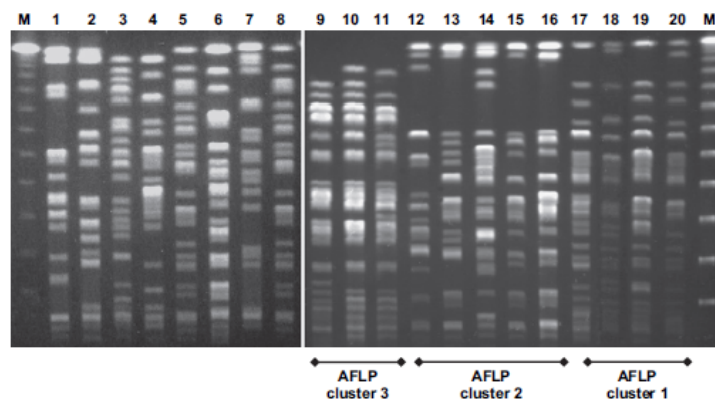


Fig. 2. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) of *SpeI*-digested genomic DNA of *P. aeruginosa* isolates from Czech CF patients. Lanes 2–8 show patterns of the isolates that are unrelated according to their AFLP fingerprints, while lanes 9–20 represent isolates which fall into three distinct AFLP clusters (indicated below the lanes). Lanes M, a lambda ladder (48.5 kb concatemer); 1, NIPH 2498; 2, NIPH 2420; 3, NIPH 2440; 4, NIPH 2493; 5, NIPH 2492; 6, NIPH 2439; 7, NIPH 2428; 8, NIPH 2423; 9, NIPH 2483; 10, NIPH 2482; 11, NIPH 2415; 12, NIPH 2448; 13, NIPH 2461; 14, NIPH 2458; 15, NIPH 2470; 16, NIPH 2414; 17, NIPH 2442; 18, NIPH 2426; 19, NIPH 2469; and 20, NIPH 2425.

patient-to-patient transmission. To investigate this possibility, we assessed potential contacts among these patients (no siblings were included in this group). First, we investigated the social contacts that had occurred among the patients at the time of organizing CF camps (until 1998), and found that five patients had actually participated in at least one CF camp. The five patients were associated with three different strain clusters: one with cluster 1, two with cluster 2 and another two with cluster 8. Except for the pairs of patients associated with clusters 2 and 8 who might have been in contact with each other, data indicate that transmission of cluster strains at the CF camps was unlikely: there were about 30 CF children at each camp, many of them included in this study; nevertheless, the cluster strains remained limited to a minor proportion of the tested patients.

It is likely that the segregation measures applied since 1998 drastically limited the intensity of social contacts among patients with CF outside the hospital. However, there may still have been some contacts at the CF centre itself, resulting from breach of the infection control guidelines. Therefore, we investigated the potential contacts that had taken place at our CF centre among patients who were later found to be positive for cluster isolates. Our analysis showed that patients with genotypically related isolates did not meet each other at more than average frequencies: there were 13 contacts inside the clusters, while the total number of contacts between patients with *P. aeruginosa* from a cluster group and patients outside the cluster groups was 2882. As contacts among patients within the same cluster were more rare than outside these clusters, it is unlikely that transmission of cluster strains took place at the centre. However, it should be noted that tracking of contacts using hospital records is only a rough proxy measure of the risk of transmission. The method cannot reflect interdepartmental variability in quality of anti-epidemic measures and it does not show whether patients were actually in close contact.

3.4. Contrasting populations of *P. aeruginosa* and *B. cenocepacia* in the Prague CF centre

A previous study at the Prague CF centre was aimed at elucidating the epidemiology of the *B. cepacia* complex, another highly significant group of bacterial pathogens associated with airway infections in CF patients [8]. It was found that the high prevalence of *B. cepacia* complex infections (30%) among patients at the CF centre was due to the spread of the single *B. cenocepacia* clone termed CZ1, which was identified in 77 (93%) of 83 *B. cepacia* complex isolates obtained from 67 patients between 2001 and 2003. This epidemic nature of infections caused by *B. cenocepacia* thus strikingly contrasts with the non-clonal distribution of *P. aeruginosa* isolates in the same patient population in 2004.

Although the actual cause for the difference in epidemiology of the two pathogens is unknown, two factors may have contributed to it. First, the Czech population of CF patients may not have been exposed to *P. aeruginosa* strains with a high epidemic potential. Second, measures taken to prevent patient-to-patient contact may have acted as a protective barrier against the dissemination of strains with epidemic potential since 1998. The anti-epidemic policy applied to prevent the spread of *B. cepacia* complex may also have had a positive effect on preventing the spread of *P. aeruginosa* by enhancing the awareness of both patients and healthcare providers, and thus further reducing the rate of patient-to-patient contacts.

In conclusion, despite the finding of a few clusters of common genotypes in different patients, the present study revealed a relatively high genetic diversity of *P. aeruginosa* strains isolated from Czech CF patients. The organisms had good in vitro susceptibility to antipseudomonal agents, suggesting that the high prevalence of *P. aeruginosa* in the CF patients was mostly due to independently acquired strains. The absence of highly epidemic *P. aeruginosa* strains may result from

infection control measures taken upon recognition of the epidemic *B. cenocepacia*.

Acknowledgments

We thank O. Nyc (Department of Clinical Microbiology, University Hospital Motol, Prague) for providing bacterial isolates, and H. Reitzova for her expert technical assistance. The study was financed by the Ministry of Health of the Czech Republic (grant no. IGA MZ ČR NR7974-3). The stay of A.N. at the Leiden University Medical Center was also supported by grant no. MSM 0021620812 of the Czech Ministry of Education, Youth and Sports.

References

- [1] D.S. Armstrong, G.M. Nixon, R. Carzino, A. Bigham, J.B. Carlin, R.M. Robins-Browne, K. Grimwood, Detection of a widespread clone of *Pseudomonas aeruginosa* in a pediatric cystic fibrosis clinic, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 166 (2002) 983–987.
- [2] K. Cheng, R.L. Smyth, J.R. Govan, C. Doherty, C. Winstanley, N. Denning, D.P. Heaf, H. van Saene, C.A. Hart, Spread of beta-lactam-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a cystic fibrosis clinic, *Lancet* 348 (1996) 639–642.
- [3] Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing Sixteenth informational supplement M100-BS16, CLSI, Wayne, PA, US, 2006.
- [4] A.J. Currie, D.P. Speert, D.J. Davidson, *Pseudomonas aeruginosa*: role in the pathogenesis of the CF lung lesion, *Semin. Respir. Crit. Care Med.* 24 (2003) 671–680.
- [5] D. De Vos, A. Lim Jr., J.P. Pirnay, M. Struelens, C. Vandenvelde, L. Duinslaeger, A. Vanderkelen, P. Cornelis, Direct detection and identification of *Pseudomonas aeruginosa* in clinical samples such as skin biopsy specimens and expectorations by multiplex PCR based on two outer membrane lipoprotein genes, *opr1* and *oprL*, *J. Clin. Microbiol.* 35 (1997) 1295–1299.
- [6] S.D. Dinesh, H. Grundmann, T.L. Pitt, U. Romling, European-wide distribution of *Pseudomonas aeruginosa* clone C, *Clin. Microbiol. Infect.* 9 (2003) 1228–1233.
- [7] P. Drevinec, H. Hrbáková, O. Cinek, J. Bartosova, O. Nyc, A. Nemeč, P. Pohunek, Direct PCR detection of *Burkholderia cepacia* complex and identification of its genomovars by using sputum as source of DNA, *J. Clin. Microbiol.* 40 (2002) 3485–3488.
- [8] P. Drevinec, S. Vosahlikova, O. Cinek, V. Vavrova, J. Bartosova, P. Pohunek, E. Mahenthalingam, Widespread clone of *Burkholderia cenocepacia* in cystic fibrosis patients in the Czech Republic, *J. Med. Microbiol.* 54 (2005) 655–659.
- [9] F. Festini, R. Buzzetti, C. Bassi, C. Braggion, D. Salvatore, G. Taccetti, G. Mastella, Isolation measures for prevention of infection with respiratory pathogens in cystic fibrosis: a systematic review, *J. Hosp. Infect.* 64 (2006) 1–6.
- [10] G. Fluge, B. Ojeniyi, N. Hoiby, A. Digranes, O. Ciofu, E. Hunstad, O.C. Haanaes, O.T. Storosten, Typing of *Pseudomonas aeruginosa* strains in Norwegian cystic fibrosis patients, *Clin. Microbiol. Infect.* 7 (2001) 238–243.
- [11] M.R. Kosorok, L. Zeng, S.E.H. West, M.J. Rock, M.L. Splaingard, A. Laxova, C.G. Green, J. Collins, P.M. Farrell, Acceleration of lung disease in children with cystic fibrosis after *Pseudomonas aeruginosa* acquisition, *Pediatr. Pulmonol.* 32 (2001) 277–287.
- [12] E. Kerem, M. Corey, R. Gold, H. Levison, Pulmonary function and clinical course in patients with cystic fibrosis after pulmonary colonization with *Pseudomonas aeruginosa*, *J. Pediatr.* 116 (1990) 714–719.
- [13] A. Nemeč, T. De Baere, I. Tjernberg, M. Vanechoutte, T.J. van der Reijden, L. Dijkshoorn, *Acinetobacter ursingii* sp. nov. and *Acinetobacter schindleri* sp. nov., isolated from human clinical specimens, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51 (2001) 1891–1899.
- [14] S.S. Pedersen, C. Koch, N. Hoiby, K. Rosendal, An epidemic spread of multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* in a cystic fibrosis centre, *J. Antimicrob. Chemother.* 17 (1986) 505–516.
- [15] U. Römling, A. Kader, D.D. Sriramulu, R. Simm, G. Kronvall, Worldwide distribution of *Pseudomonas aeruginosa* clone C strains in the aquatic environment and cystic fibrosis patients, *Environ. Microbiol.* 7 (2005) 1029–1038.
- [16] F.W. Scott, T.L. Pitt, Identification and characterization of transmissible *Pseudomonas aeruginosa* strains in cystic fibrosis patients in England and Wales, *J. Med. Microbiol.* 53 (2004) 609–715.
- [17] S. Silbert, A.L. Barth, H.S. Sader, Heterogeneity of *Pseudomonas aeruginosa* in Brazilian cystic fibrosis patients, *J. Clin. Microbiol.* 39 (2001) 3976–3981.
- [18] D.P. Speert, M.E. Campbell, D.A. Henry, R. Milner, F. Taha, A. Gravelle, A.G. Davidson, L.T. Wong, E. Mahenthalingam, Epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis in British Columbia, Canada, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 166 (2002) 988–993.
- [19] D. Tubbs, W. Lenney, P. Alcock, C.A. Campbell, J. Gray, C. Pantin, *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: cross-infection and the need for segregation, *Respir. Med.* 95 (2001) 147–152.
- [20] UK Cystic Fibrosis Trust Infection Control Group, *Pseudomonas aeruginosa* Infection in People with Cystic Fibrosis. Suggestions for Prevention and Infection Control, Cystic Fibrosis Trust, Bromley, 2001.
- [21] UK Cystic Fibrosis Trust Infection Control Group, The *Burkholderia cepacia* complex. Suggestions for prevention and infection control, Cystic Fibrosis Trust, Bromley, 2004.
- [22] S.G. Van Daele, H. Franckx, R. Verhelst, P. Schelstraete, F. Haerynck, L. Van Simaey, G. Claeys, M. Vanechoutte, F. de Baets, Epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* in a cystic fibrosis rehabilitation centre, *Eur. Respir. J.* 25 (2005) 474–481.
- [23] S. Van Daele, M. Vanechoutte, K. De Boeck, C. Knoop, A. Malfroot, P. Lebecque, J. Leclercq-Foucart, L. Van Schil, K. Desager, F. De Baets, Survey of *Pseudomonas aeruginosa* genotypes in colonised cystic fibrosis patients, *Eur. Respir. J.* 28 (2006) 740–747.

10.2. Příloha č. 2

Direct culture – independent strain typing of *Burkholderia cepacia* complex in sputum samples from patients with cystic fibrosis.

Drevinek P., Vosahlikova S., Dedeckova K., Cinek O., Mahenthiralingam E. *Journal of Clinical Microbiology* 2010. May; 48 (5): 1888–91.

Direct Culture-Independent Strain Typing of *Burkholderia cepacia* Complex in Sputum Samples from Patients with Cystic Fibrosis[∇]

Pavel Drevinek,^{1*} Sarka Vosahlikova,¹ Klara Dedeckova,¹
Ondrej Cinek,¹ and Eshwar Mahenthiralingam²

Department of Pediatrics, 2nd Medical School, Charles University, Prague, Czech Republic,¹ and Cardiff School of Biosciences, Cardiff University, Cardiff, United Kingdom²

Received 2 December 2009/Returned for modification 15 January 2010/Accepted 19 February 2010

We examined if multilocus sequence typing (MLST), a method for genotyping and species identification of *Burkholderia cepacia* complex bacteria, could be applied directly to cystic fibrosis sputum. The redesigned nested-PCR MLST format was successfully used to accurately identify strains in 23 sputum samples, of which 8 were culture negative.

Burkholderia cepacia complex (BCC) organisms have the capacity to spread within populations of patients with cystic fibrosis (CF) and to cause serious epidemic outbreaks (6, 16). Strict infection control measures are therefore in place in many CF centers to prevent person-to-person transmission of the organisms. Correct identification of BCC organisms in clinical specimens is an essential prerequisite for implementing a successful infection control system. The 17 bacterial species that form the BCC taxonomic cluster today (9, 12, 13) can only be accurately distinguished from each other by applying molecular genetic methods. Although several protocols have been developed to discriminate individual species (4, 8, 10), multilocus sequence typing (MLST) has proven to be the only method which has kept pace with the increasing complexity of BCC species. By sequence analysis of seven housekeeping genes, MLST enables unequivocal identification of all established BCC species and also has the advantage of being able to define novel BCC groups (1, 3, 7). In addition, it can serve as a highly standardized genotyping method that provides robust information on strain type, by defining a sequence type (ST).

There is great potential in DNA-based identification methods, as they provide the possibility to detect minute quantities of BCC bacteria directly in clinical specimens. We previously described a diagnostic nested *recA* PCR with excellent sensitivity (5) that enabled the detection of BCC bacteria in sputum, weeks to months before patients became culture positive. Such direct PCR testing narrowed the diagnostic window between the time of the initial BCC infection and laboratory diagnosis and had a great impact on implementing infection control in advance of what was routine with conventional microbiology.

Using direct PCR analysis, several instances of samples that were BCC positive by PCR, but not by culture, were identified. Follow-up of such cases was rather limited, as the *recA* PCR we used (5) did not allow strain identification, and with no culture to examine, conventional typing methods were ineffective. Yet

obtaining the strain type information for such patients is vital in understanding the epidemiology behind their infection with BCC bacteria. All gel pattern-based genotyping systems such as pulsed-field gel electrophoresis require pure bacterial cultures that were not available in the reproducibly PCR-positive, but culture-negative patients. Although MLST is also a typing method primarily designed to work from pure bacterial cultures, in principle since it is based on DNA and PCR amplification, its applicability to samples where bacteria are present in a small, noncultivable amount was not ruled out.

We hypothesized that typing of the low quantities of BCC strains in such PCR-positive cultures was feasible without the need for obtaining pure cultures, if MLST was directly applied to total DNA extracted from sputum. In order to increase MLST sensitivity and to make it comparable to double-round PCR-based detection of BCC from sputa (5), the original MLST protocol for BCC (1) was modified to a redesigned nested-PCR format. The primers used for sequence analysis in the original MLST method already formed a primer pair that was internal to the allele-specific amplification primers. Therefore, they were employed, in addition to sequencing, for a second round of the nested PCR.

To investigate the applicability of MLST for direct sputum genotyping of BCC bacteria, 23 sputum samples from 17 CF patients were examined (Table 1). The sputum samples were representatives of the following diagnostic eventualities: (i) the extent of BCC positivity, as determined by nested PCR, with 9 samples positive at round 1 and 14 positive only after 2 rounds of this nested PCR; (ii) the differential ability to cultivate BCC organisms, with 8 culture-negative and 15 culture-positive samples; (iii) situations involving multiple BCC species, as identified by the *recA* species-specific PCRs, with 10 *Burkholderia cenocepacia* IIIA, 2 *B. cenocepacia* IIIB, 4 *Burkholderia multivorans*, and 3 *Burkholderia stabilis* samples, as well as 4 samples of indeterminate BCC species; and (iv) presence/absence of coinfection with *Pseudomonas aeruginosa* (10 samples culture positive and 13 culture negative for *P. aeruginosa*). In addition, for four of the patients studied, sputa were sampled at multiple clinic visits: for 3 patients (patients 10, 14, and 17; Table 1), two samples were obtained 5, 2, and 9 months apart, respectively, and for patient 9, four consecutive samples were

* Corresponding author. Mailing address: Department of Pediatrics, 2nd Medical School, Charles University, V Uvalu 84, 150 06 Prague, Czech Republic. Phone: 420 2 2443 2001. Fax: 420 2 2443 2020. E-mail: pavel.drevinek@Lfmotol.cuni.cz.

[∇] Published ahead of print on 24 February 2010.

TABLE 1. Characteristics of sputum samples examined in this study

Patient	Sample ID no.	Identification of BCC by nested PCR and culture			MLST analysis of BCC	
		PCR round at which detected	Species identified	Culture	ST	Species identified
1	5884	1	<i>B. cenocepacia</i> IIIA	+	32	<i>B. cenocepacia</i> IIIA
2	6140	1	<i>B. cenocepacia</i> IIIA	+	32	<i>B. cenocepacia</i> IIIA
3	5475	1	<i>B. cenocepacia</i> IIIA	+	32	<i>B. cenocepacia</i> IIIA
4	5938	2	<i>B. cenocepacia</i> IIIA	–	32	<i>B. cenocepacia</i> IIIA
5	5883	2	<i>B. cenocepacia</i> IIIA	+	211	<i>B. cenocepacia</i> IIIA
6	5780	2	<i>B. cenocepacia</i> IIIA	–	234	<i>B. cenocepacia</i> IIIA
7	6144	1	<i>B. cenocepacia</i> IIIA	+	234	<i>B. cenocepacia</i> IIIA
8	5911	1	<i>B. cenocepacia</i> IIIA	+	234	<i>B. cenocepacia</i> IIIA
9	4871	2	Indeterminate	+	102, 482	<i>B. contaminans</i>
	4941	1	<i>B. cenocepacia</i> IIIA	+	482	<i>B. contaminans</i>
	5315	1	<i>B. cenocepacia</i> IIIA	+	102, 482	<i>B. contaminans</i>
	5445	2	Indeterminate	–	482	<i>B. contaminans</i>
10	5662	2	Indeterminate	+	102	<i>B. contaminans</i>
	6070	2	Indeterminate	–	102	<i>B. contaminans</i>
11	5983	1	<i>B. cenocepacia</i> IIIB	+	184	<i>B. cenocepacia</i> IIIB
12	6072	2	<i>B. cenocepacia</i> IIIB	+	184	<i>B. cenocepacia</i> IIIB
13	5699	1	<i>B. multivorans</i>	+	180	<i>B. multivorans</i>
14	5781	2	<i>B. multivorans</i>	–	564	<i>B. multivorans</i>
	5984	2	<i>B. multivorans</i>	–	564	<i>B. multivorans</i>
15	5747	2	<i>B. multivorans</i>	–	562	<i>B. multivorans</i>
16	4894	2	<i>B. stabilis</i>	–	51	<i>B. stabilis</i>
17	4934	2	<i>B. stabilis</i>	+	563	<i>B. stabilis</i>
	5702	2	<i>B. stabilis</i>	+	563	<i>B. stabilis</i>

received at time intervals of 1, 6, and 7.5 months from the first sampling point.

The PCR conditions for MLST round 1 amplification were as follows. A PCR for each MLST allele was carried out in a 20- μ l volume with 2.0 mM MgCl₂, 0.2 mM deoxynucleoside triphosphates (dNTPs), 10 pmol “amplification primers” (1), 1 \times Q solution, and 0.75 U *Taq* polymerase (all PCR reagents were obtained from Qiagen, Hilden, Germany) and 1 μ l bacterial DNA extracted from clinical samples with an Amplicor respiratory specimen preparation kit (Roche, Indianapolis, IN). The PCR program was run on a TGradient thermocycler (Biometra, Goettingen, Germany) with initial denaturation for 5 min at 96°C and a subsequent 30 cycles of 30 s at 96°C, 30 s at 55°C, and 2 min at 72°C. An internal DNA fragment was then amplified in a second PCR with reaction chemistry identical to round 1, except that the sequencing primers (1) and 1 μ l PCR product from round 1 were incorporated. The thermal cycling profile for round 2 was as follows. Initial denaturation was at 96°C for 2 min followed by a subsequent run of 35 cycles, each comprising 15 s at 96°C, 30 s of annealing (see

below), and 45 s at 72°C. The annealing temperature was set to decrease from 60°C in the first cycle by 0.5°C per cycle over the next 10 cycles to reach the final annealing temperature of 55°C, which was then kept for the last 25 cycles of PCR. The detection limit of the nested PCR was determined by serial decimal dilutions of DNA from a *B. cenocepacia* culture of known viability that had been extracted in the same way as the sputum samples.

Successful MLST data were obtained for every sample examined, including those samples which were culture negative and those which were amplification negative after 1 round of the *recA* diagnostic PCR (summarized in Table 1). If a single MLST allele was not detected after completion of the first MLST-PCR round, all seven genes of the sample were subjected to the round 2 PCR. The threshold of this setup was found for each of the seven MLST genes at $\sim 10^4$ CFU/ml (10 CFU per reaction). Out of 161 sequencing PCRs performed (23 samples \times 7 MLST genes), only one reaction failed repeatedly to give a readable sequence (the *phaC* allele for sample 5445); however a complete ST profile for this strain was

particularly in situations where culture results remain negative due to a low bacterial load during infection. In such cases, only direct MLST on sputum can provide information on strain type and facilitate the complete analysis of a local epidemiological situation, a vital prerequisite for effective BCC surveillance and infection control in every CF center.

This work was supported by grants from the Czech Ministry of Health (NS 10543-3) and the Czech Ministry of Education (MSM0021620812).

We thank Helena Reitzova for excellent technical assistance.

REFERENCES

- Baldwin, A., E. Mahenthalingam, K. M. Thickett, D. Honeybourne, M. C. Maiden, J. R. Govan, D. P. Speert, J. J. LiPuma, P. Vandamme, and C. G. Dowson. 2005. Multilocus sequence typing scheme that provides both species and strain differentiation for the *Burkholderia cepacia* complex. *J. Clin. Microbiol.* 43:4665–4673.
- Bernhardt, S. A., T. Spilker, T. Coffey, and J. J. LiPuma. 2003. *Burkholderia cepacia* complex in cystic fibrosis: frequency of strain replacement during chronic infection. *Clin. Infect. Dis.* 37:780–785.
- Cesarini, S., A. Bevivino, S. Tabacchioni, L. Chiarini, and C. Dalmastrì. 2009. *recA* gene sequence and multilocus sequence typing for species-level resolution of *Burkholderia cepacia* complex isolates. *Let. Appl. Microbiol.* 49:580–588.
- Drevinek, P., A. Baldwin, C. G. Dowson, and E. Mahenthalingam. 2008. Diversity of the *parB* and *repA* genes of the *Burkholderia cepacia* complex and their utility for rapid identification of *Burkholderia cenocepacia*. *BMC Microbiol.* 8:44.
- Drevinek, P., H. Hrbáková, O. Cinek, J. Bartosova, O. Nyc, A. Nemeč, and P. Pohunek. 2002. Direct PCR detection of *Burkholderia cepacia* complex and identification of its genomovars by using sputum as source of DNA. *J. Clin. Microbiol.* 40:3485–3488.
- Jones, A. M., M. E. Dodd, J. R. Govan, V. Barcus, C. J. Doherty, J. Morris, and A. K. Webb. 2004. *Burkholderia cenocepacia* and *Burkholderia multivorans*: influence on survival in cystic fibrosis. *Thorax* 59:948–951.
- Mahenthalingam, E., A. Baldwin, P. Drevinek, E. Vanlaere, P. Vandamme, J. J. LiPuma, and C. G. Dowson. 2006. Multilocus sequence typing breathes life into a microbial metagenome. *PLoS One* 1:e17.
- Mahenthalingam, E., J. Bischof, S. K. Byrne, C. Radomski, J. E. Davies, Y. Av-Gay, and P. Vandamme. 2000. DNA-based diagnostic approaches for identification of *Burkholderia cepacia* complex, *Burkholderia vietnamiensis*, *Burkholderia multivorans*, *Burkholderia stabilis*, and *Burkholderia cepacia* genomovars I and III. *J. Clin. Microbiol.* 38:3165–3173.
- Mahenthalingam, E., T. A. Urban, and J. B. Goldberg. 2005. The multifarious, multireplicon *Burkholderia cepacia* complex. *Nat. Rev. Microbiol.* 3:144–156.
- Moore, J. E., J. Xu, B. C. Millar, M. Crowe, and J. S. Elborn. 2002. Improved molecular detection of *Burkholderia cepacia* genomovar III and *Burkholderia multivorans* directly from sputum of patients with cystic fibrosis. *J. Microbiol. Methods* 49:183–191.
- Spilker, T., A. Baldwin, A. Bumford, C. G. Dowson, E. Mahenthalingam, and J. J. LiPuma. 2009. Expanded multilocus sequence typing for *Burkholderia* species. *J. Clin. Microbiol.* 47:2607–2610.
- Vanlaere, E., A. Baldwin, D. Gevers, D. Henry, E. De Brandt, J. J. LiPuma, E. Mahenthalingam, D. P. Speert, C. Dowson, and P. Vandamme. 2009. Taxon K, a complex within the *Burkholderia cepacia* complex, comprises at least two novel species, *Burkholderia contaminans* sp. nov. and *Burkholderia lata* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59:102–111.
- Vanlaere, E., J. J. LiPuma, A. Baldwin, D. Henry, E. De Brandt, E. Mahenthalingam, D. Speert, C. Dowson, and P. Vandamme. 2008. *Burkholderia latens* sp. nov., *Burkholderia diffusa* sp. nov., *Burkholderia arboris* sp. nov., *Burkholderia seminalis* sp. nov. and *Burkholderia metallica* sp. nov., novel species within the *Burkholderia cepacia* complex. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58:1580–1590.
- Waite, D. J., D. Honeybourne, E. G. Smith, J. L. Whitehouse, and C. G. Dowson. 2009. Cross-sectional and longitudinal multilocus sequence typing studies of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis sputum. *J. Clin. Microbiol.* 47:3444–3448.
- Wellinghausen, N., and J. Kothe. 2006. Evidence of coinfection with distinct strains of *Burkholderia multivorans* in a cystic fibrosis patient. *Infection* 34:289–291.
- Whiteford, M. L., J. D. Wilkinson, J. H. McColl, F. M. Conlon, J. R. Michie, T. J. Evans, and J. Y. Paton. 1995. Outcome of *Burkholderia* (*Pseudomonas*) *cepacia* colonisation in children with cystic fibrosis following a hospital outbreak. *Thorax* 50:1194–1198.

10.3. Příloha č. 3

Oxidative stress of *Burkholderia cenocepacia* induces insertion sequence – mediated genomic rearrangements that interfere with macrorestriction – based genotyping.

Drevinek P., Baldwin A., Lindenburg L., Lovleen T. J., Marchbank A., Vosahlikova S., Dowson Ch. G., Mahenthiralingam E. *Journal of Clinical Microbiology*, Jan 2010, p. 34–40

Oxidative Stress of *Burkholderia cenocepacia* Induces Insertion Sequence-Mediated Genomic Rearrangements That Interfere with Macrorestriction-Based Genotyping[∇]

Pavel Drevínek,^{1,3*} Adam Baldwin,² Laurens Lindenburg,¹ Lovleen Tina Joshi,¹ Angela Marchbank,¹ Sarka Vosahlikova,³ Christopher G. Dowson,² and Eshwar Mahenthiralingam¹

Cardiff School of Biosciences, Cardiff University, Cardiff,¹ and Department of Biological Sciences, Warwick University, Coventry,² United Kingdom, and Paediatric Department, 2nd Medical School, Charles University, Prague, Czech Republic³

Received 23 July 2009/Returned for modification 28 August 2009/Accepted 26 October 2009

Burkholderia cenocepacia can cause serious infections and epidemics in patients with cystic fibrosis (CF). A CF population in the Czech Republic experienced an epidemic outbreak caused by a *B. cenocepacia* ST-32 strain. The clonality of the isolates was evident by multilocus sequence typing; however, fingerprinting profiles obtained by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) showed substantial band variability. We investigated whether the PFGE pattern diversity resulted from genomic rearrangements mediated by insertion sequences (IS); in addition, we determined whether stressful growth conditions altered the transposition activity of these IS. DNA probes for IS commonly found in *B. cenocepacia* were designed using the *B. cenocepacia* J2315 genome. Southern hybridization analysis of ST-32 isolates demonstrated diversity in both the copy number and the insertion site for a homologue of ISBcen20. Movement of the ISBcen20 homologue was detected when the ST-32 isolate CZ1238 was exposed to oxidative stress (growth in the presence of H₂O₂). PFGE analysis of CZ1238 derivatives exposed to oxidative stress demonstrated genomic rearrangements. Interestingly, when the closely related *B. cenocepacia* strain J2315 was exposed to oxidative stress, no movement of ISBcen20 was detected. Since frameshift mutations are present within the transposases of all copies of this IS in J2315, our data suggest that the transposase is inactive. In summary, we have demonstrated for the first time that IS movement can be mediated by oxidative stress and can lead to genomic rearrangements in the CF pathogen *B. cenocepacia*. These IS movements may alter the PFGE fingerprints of isolates that are clonal by other typing methods.

Burkholderia cenocepacia is a member of the *Burkholderia cepacia* complex (Bcc), a group of opportunistic pathogens that cause devastating infections in persons with cystic fibrosis (CF). Infection of a CF patient with these bacteria is usually chronic, becomes resistant to antibiotic treatment, and may be transmissible to other CF patients (15). The majority of known transmissible strains belong to the species *B. cenocepacia*, which is considered one of the most severe pathogens of all Bcc organisms. The epidemic lineage historically called ET-12, randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) type 02, or the cable pilus strain (reviewed in reference 12) has been causing infections in the United Kingdom and Canada for the past 20 years (14, 20). Other epidemic clones of *B. cenocepacia* identified in Canada have been designated RAPD types 01, 04, and 06 (14, 19). Strains that were genetically very closely related to the Canadian RAPD 01 strain were detected a few years later in almost 30% of CF patients from the Czech Republic (an epidemic clone designated CZ1) (6).

Nearly all these transmissible CF strains were first defined by the use of pattern-matching fingerprinting techniques such as pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) and/or RAPD (reviewed in reference 12). Despite the fact that computer software can enable the clustering of closely related fingerprints,

the criteria for data analysis may not be easy to apply and may lead to results that are hard to interpret. For example, considerable variation was observed in the PFGE profiles of 77 isolates from the Czech epidemiological survey (differing by as many as 8 bands); however, RAPD analysis of the same set of isolates demonstrated that they all belonged to the single epidemic strain CZ1 (6).

The drawbacks of gel-based typing methods have recently been overcome by an alternative approach, multilocus sequence typing (MLST), that compares the nucleotide sequences of seven housekeeping genes of the Bcc (2). MLST analysis of the Bcc has a number of useful attributes: (i) since MLST is a DNA sequence-based method, all information on strain sequence types (STs) can be stored in a public database that allows lab-to-lab comparison of results; (ii) MLST provides strain genotype information as well as identifying isolates to the species level, a feature that has facilitated the recent characterization of several new Bcc species (21, 22); (iii) MLST has excellent resolving power, which has enabled the matching of clonal strains residing in the environment and in patients with clinical infections (1), as well as the tracing of the global distribution of major Bcc clones, such as *Burkholderia contaminans* ST-102 (13). Since MLST examines components of the core genome of Bcc bacteria, it is unlikely to be affected by genomic rearrangements within these bacteria.

We hypothesized that the intrastrain PFGE band heterogeneity observed for the Czech epidemic strain (6) may have resulted from genomic rearrangements mediated by the movement of insertion sequences (IS), which are highly abundant in

* Corresponding author. Mailing address: Paediatric Department, 2nd Medical School, Charles University, Prague, Czech Republic. Phone: 420 2 2443 2026. Fax: 420 2 2443 2020. E-mail: pavel.drevinek@Lfmotol.cuni.cz.

[∇] Published ahead of print on 4 November 2009.

TABLE 1. Primers used for multiplex PCR to detect all nine copies of ISBcen20 present in the genome of *B. cenocepacia* J2315

Insertion point (gene no. of ISBcen20)	Sequence (5' to 3')	Product size (bp)	Primer concn (μ M)	Multiplex PCR no.
Reverse primers				
1 (BCAL0573)	AGGAAATCGCCGCGATTC	322	1	M1
2 (BCAL1125)	TCTCGAACTGGAAGTGCC	387	0.75	M2
3 (BCAL1133)	TCGACGAAAGGGTGACAC	491	0.4	M3
4 (BCAL2480b)	TCGAACCGGAAGTCTCC	557	1	M1
5 (BCAL2496)	CAGACTGGGTTGATCGAG	639	1.5	M2
6 (BCAL3126b)	TCTCCTTGTGAGTTCGAC	725	1.25	M3
7 (BCAL3484)	TTCGATCCTGCGTTTCGAC	821	1	M1
8 (BCAM1906)	TGCAGAAGCAAGGGCATC	896	1.5	M2
9 (BCAM1925)	TGTTCCCGTATATCGGGC	944	1.75	M3
Forward primer, 1 to 9				
	TCAGTTGTTCCGATGCCTG			

Bcc genomes (11). Genome sequence analysis of *B. cenocepacia* strain J2315 (ST-28) revealed that it possessed 22 different types of IS elements, 4 of which were present at high copy numbers (more than 5 copies per genome): IS407 (13 copies), ISBcen8 (12 copies), ISBcen9 (9 copies), and ISBcen20 (9 copies) (7). Enhanced transposition activity of mobile elements in bacteria in response to various stress conditions, such as high temperature (17) and starvation (8), has been observed. Another stress stimulus that may play a role in potentiating IS movement in bacteria during CF infection is oxidative stress mediated by toxic reactive oxygen species (ROS). Evidence for this assumption was presented in a recent transcriptomic study of the oral bacterium *Porphyromonas gingivalis*, which, when exposed to H₂O₂, demonstrated concerted overexpression of one IS family (4). The aims of our study were (i) to characterize the distribution of selected IS elements in the Czech epidemic strain CZ1 (designated ST-32 by MLST [1]), (ii) to evaluate their possible link to the heterogeneous fingerprints of CZ1 generated by PFGE, and (iii) to examine whether oxidative stress conditions promoted the movement of IS elements within the genomes of strain CZ1 and the sequenced *B. cenocepacia* strain J2315 (ST-28).

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains. In total, 31 isolates belonging to 4 different *B. cenocepacia* STs defined by RAPD/PFGE genotyping (6) or MLST (2) were included in the study: ST-32 (the ST of the Czech epidemic strain) (14 isolates), ST-28 (6 isolates), ST-234 (7 isolates), and ST-210 (4 isolates). These isolates were drawn from the Cardiff University collection, Cardiff, Wales, United Kingdom (12).

Exposure to H₂O₂. Isolate CZ1238 (BCC0961; representative of strain CZ1) and strain J2315 were used to study the effect of oxidative stress on the plasticity of the *B. cenocepacia* genome. A 1.5-ml aliquot of a culture of each strain (grown in Luria-Bertani [LB] broth at 37°C with shaking at 150 rpm to the mid-log growth phase; $\sim 5 \times 10^8$ cells) was harvested by centrifugation (1,500 $\times g$ for 5 min). The bacterial pellet was resuspended in 3 ml of basal salts medium (18) containing 22 mM glucose, 0.05% Casamino Acids, and hydrogen peroxide at subinhibitory concentrations for each respective strain (0.01% for CZ1238 and 0.1% for J2315). Incubation in the presence of H₂O₂ was continued until the cultures reached an optical density at 600 nm (OD₆₀₀) of 0.6 (~ 10 to 16 h of growth), after which the cultures were serially diluted and plated out onto tryptic soya agar plates to obtain single colonies. For *B. cenocepacia* CZ1238, 7 single colonies were individually cultivated for storage and further study. For *B. cenocepacia* J2315, 96 single colonies were picked into a 96-well plate containing 150 μ l of LB medium, grown overnight at 37°C, and then stored at -80°C after the addition of dimethyl sulfoxide.

Serial passage. To assess the stability of ISBcen20 during growth passage at 37°C, *B. cenocepacia* CZ1238 was treated as follows. After overnight growth in LB broth, CZ1238 was plated onto an LB agar plate and left to grow for 24 h. One colony was then picked and transferred to LB broth to initiate another

overnight growth. This cycle of growth and plating was repeated 8 more times to obtain a derivative of isolate CZ1238 that had passed through 9 sequential cultivation cycles; 7 single colonies of this derivative were individually cultivated for storage and further study.

Heat shock. To examine the effect of an elevated temperature on IS stability in *B. cenocepacia* CZ1238, an overnight broth culture of CZ1238 was agitated in a 42°C water bath for 30 min before being serially diluted and plated for individual colonies on tryptic soya agar plates. Seven single colonies were then picked and cultivated for storage and further study.

Multiplex PCR. To detect all nine copies of ISBcen20 present in the genome of *B. cenocepacia* J2315, a universal forward primer and nine reverse primers, each specific to one of nine IS insertion points, were designed (Table 1). The distance of each reverse primer from the common forward primer differed from each other by at least 50 bp; therefore, the resulting amplicons were analyzed in a multiplex PCR format as follows. Detection of all nine IS copies was split into three multiplex PCRs, each identifying three of the ISBcen20 insertion points (i.e., PCR M1 detected insertion points 1, 4, and 7; PCR M2 detected insertion points 2, 5, and 8; and PCR M3 detected insertion points 3, 6, and 9 [see Table 1 for combinations]). A PCR for any primer combination was carried out in a volume of 20 μ l with 1 μ l of DNA extracted with 5% Chelex (200/400 mesh; Bio-Rad, Hemel Hempstead, United Kingdom) and with reagents of the *Taq* PCR core kit (Qiagen, Germany) consisting of 1 \times PCR buffer, 1 \times Solution Q, 3.7 mM MgCl₂, 0.2 mM (each) deoxynucleoside triphosphate (dNTP), and 0.75 U of *Taq* polymerase. Primer concentrations are specified in Table 1; the concentration of the universal forward primer was equal to the concentration of the corresponding reverse primer in every respective primer pair. The PCR program was run on a Dyad DNA engine thermal cycler (Bio-Rad Laboratories, Hemel Hempstead, United Kingdom) with initial denaturation for 5 min at 94°C and a subsequent run of 30 cycles, each comprising 30 s at 94°C, 30 s at 60°C, and 45 s at 72°C. The PCR products were separated on a 2% agarose gel with 1 \times Tris-borate-EDTA at 3.5 V/cm.

RFLP and Southern hybridization. All 31 clinical isolates described above were subjected to restriction fragment length polymorphism (RFLP) and Southern hybridization as follows. High-molecular-weight genomic DNA was extracted as described previously (14), and approximately 1.5 μ g of DNA was digested for 3 to 4 h with 80 U of EcoRI (Promega). The digested DNA was separated on a 1% agarose gel at 0.8 V/cm for 15 h and was then transferred to a positively charged nylon membrane.

Digoxigenin (DIG)-labeled hybridization probes specific to insertion sequences ISBcen20, ISBcen8, ISBcen9, and IS407 were amplified from *B. cenocepacia* J2315 using the primers shown in Table 2. To facilitate labeling, the following PCR mixture was prepared in a 25- μ l reaction mixture: 1 \times PCR DIG labeling mix (Roche Applied Science), 1 \times PCR buffer (Promega), 1.5 μ M MgCl₂, 0.5 μ M (each) primers, 0.2 mM (each) dNTP, and 1 U of *Taq* polymerase (Promega). The PCR thermal conditions were identical to those used for multiplex PCR. Probe-target hybridization and chemiluminescence-based detection were performed according to the manufacturer's instructions (Roche Applied Science). Each probe was added to the hybridization solution at a concentration of approximately 20 ng/ml, and the membranes were left to hybridize at 50°C overnight. The degree of pattern similarity between individual isolates was analyzed by the unweighted-pair group method using arithmetic means in GelCompar II software (version 5.1; Applied Maths, Belgium).

Southern hybridization analysis with the ISBcen20 probe was also performed

TABLE 2. Primers used in IS-specific PCR

IS detected	Sequence (5' to 3')	Product size (bp)
ISBcen20	TGATCGAGCCGTTATTGC GCAGCAACCGAGTTTGGAG	736
ISBcen8	GACGTCGCAAAAAGCTCAC GCGACCTTGGACAGTTTG	842
ISBcen9	CGCAATGCCAAAAACACC TTGATGCGCTCGTGATTG	953
IS407	GGTTCAGTGATGCGTCGT GGAAAGCGGCAGGAGTAT	1,016

on DNA extracted from cultures of each of the CZ1238 derivatives obtained from heat shock, serial passage, and exposure to H₂O₂.

Macrorestriction typing. A fingerprinting method based on DNA digestion followed by PFGE was performed exactly as described previously (6). Briefly, the genomic DNA embedded in 2% low-gelling-temperature agarose (Sigma) was digested with 3 U of SpeI (Promega) at 37°C overnight and was then separated on a 1.2% pulsed-field certified agarose gel (Bio-Rad) for 24 h under the following conditions: 6 V/cm; switch time, 1 to 40 s for the initial 10 h and 30 to 90 s for the remaining 14 h. The resulting banding patterns were compared by using GelCompar II.

RESULTS

The Czech epidemic strain is part of a globally distributed *B. cenocepacia* lineage. The PFGE fingerprints of isolates belonging to the Czech epidemic strain had previously been shown to be highly variable (6). MLST analysis of 10 CZ1 isolates demonstrated that they all belonged to a single sequence type, ST-32, corroborating previous RAPD analysis that had indicated they were clonal (6) and demonstrating that PFGE fingerprinting had detected rapid evolution in these isolates as a result of genomic rearrangements. Further examination of our strain collection demonstrated the presence of 35 additional ST-32 isolates. These comprised *B. cenocepacia*

isolates recovered from individuals with CF and from humans with infections not linked to CF. One environmental ST-32 isolate from Mexico had been described in a previous study (1). Overall, the ST-32 isolates in our collection were globally distributed, indicating that this ST is another highly virulent *B. cenocepacia* strain IIIA lineage like the ET-12 lineage (12).

Presence of selected IS elements in *B. cenocepacia*. Fourteen Czech ST-32 isolates were examined by RFLP followed by Southern hybridization for the presence of homologues of the IS elements in the *B. cenocepacia* J2315 genome. Four IS elements were specifically looked for, since they represented those with the highest copy numbers, which were most likely to mediate genomic rearrangements (7): ISBcen20 (9 copies), ISBcen8 (12 copies), ISBcen9 (9 copies), and IS407 (13 copies). No homologues of ISBcen9 or IS407 were detected in any of the ST-32 isolates examined (data not shown). The remaining IS elements tested were found in multiple copies in the ST-32 isolates, ranging from 12 to 19 copies for ISBcen20 (Fig. 1A) and 6 to 12 copies for ISBcen8 (Fig. 1B). When the IS RFLP hybridization profiles were compared computationally, much greater heterogeneity was detected for ISBcen20, with only 6 of the 14 isolates showing more than 50% fingerprint similarity (data not shown). Application of the same cutoff to the ISBcen8 fingerprints demonstrated that a majority of the Czech ST-32 isolates (11 out of 14) fell into one cluster. These data demonstrated that the ISBcen20 homologue in the ST-32 isolates appeared far more active, with rapid evolution in the insertion site and copy number in a strain that was clonal in the core genome, as indicated by the single MLST type.

The IS RFLP hybridization profiles of three other epidemic *B. cenocepacia* IIIA strains (14, 19) were examined: strains belonging to ST-28 (RAPD type 02; ET-12 lineage), ST-234 (RAPD type 04), and ST-210 (RAPD type 06). The *B. cenocepacia* ST-28 and ST-234 strains contained multiple copies of ISBcen20 and ISBcen8 homologues; the banding patterns for ISBcen20 were more variable, results correlating with those for the Czech epidemic strain (Fig. 2). Further examination of

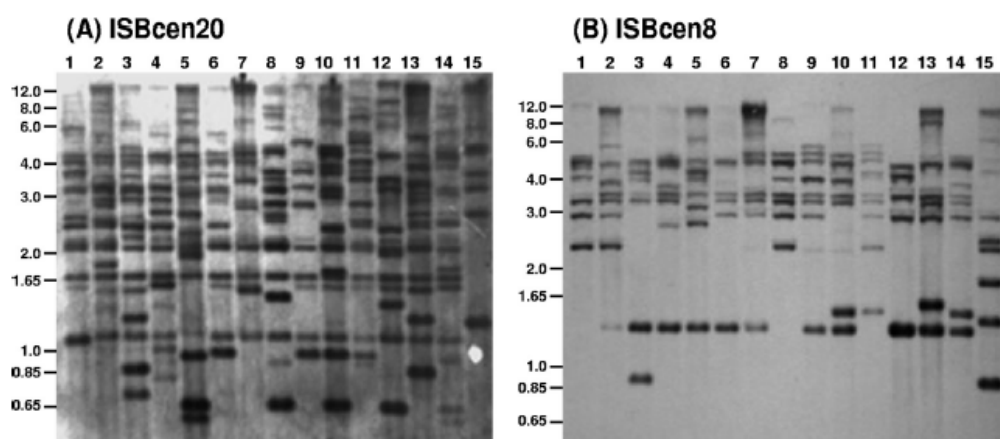


FIG. 1. Southern hybridization of ST-32 isolates with ISBcen20 (A) and ISBcen8 (B) probes. Samples are as follows: lanes 1, BCC0817; lanes 2, BCC0818; lanes 3, BCC0961; lanes 4, BCC0851; lanes 5, BCC0896; lanes 6, BCC0885; lanes 7, BCC1110; lanes 8, BCC1114; lanes 9, BCC1111; lanes 10, BCC1112; lanes 11, BCC1113; lanes 12, BCC1121; lanes 13, BCC1126; lanes 14, BCC1128; lanes 15, reference strain J2315 (ST-28). The approximate positions of the molecular size markers (in kilobases) from the agarose gel electrophoresis of the DNA are indicated to the left of each gel.

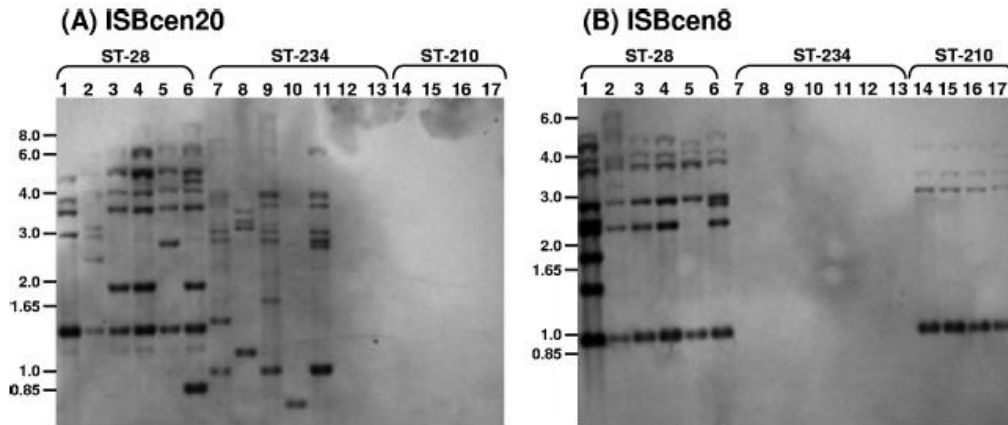


FIG. 2. Southern hybridization of isolates of three STs (given above the lane numbers) with ISBcen20 (A) and ISBcen8 (B) probes. Samples are as follows: lanes 1, J2315; lanes 2, BCC0313; lanes 3, BCC0162; lanes 4, BCC0163; lanes 5, BCC0164; lanes 6, BCC0077; lanes 7, BCC0575; lanes 8, BCC0107; lanes 9, BCC1168; lanes 10, BCC0078; lanes 11, BCC0534; lanes 12, BCC0222; lanes 13, BCC0223; lanes 14, BCC0536; lanes 15, BCC0541; lanes 16, BCC0514; lanes 17, BCC0098. The approximate positions of the molecular size markers (in kilobases) from the agarose gel electrophoresis of the DNA are indicated to the left of each gel.

additional ST-234 isolates demonstrated that two out of seven lacked ISBcen20 homologues, suggesting that positive and negative IS variants can exist for this lineage. Only ISBcen8 was detected in the four *B. cenocepacia* ST-210 isolates tested; ISBcen20 was absent from all four. Since the ISBcen20 homologue had exhibited higher diversity in its copy number and distribution in ST-32 isolates than ISBcen8, we chose to focus our further work on the former element, assuming that this was most likely an active mobile element contributing to the rapid genomic rearrangements observed by PFGE (6).

Movement of ISBcen20 in ST-32. To assess the degree of ISBcen20 movement under physiological and stress conditions, isolate CZ1238, a representative of *B. cenocepacia* ST-32, was

subjected either to serial passage on nutrient medium, to a heat shock, or to growth in a subinhibitory concentration of H_2O_2 (see Materials and Methods). No alterations in the intragenomic distribution of ISBcen20 were detected in a set of seven subcultures passaged on agar or in seven colonies exposed to a heat shock (data not shown). However, oxidative stress induced by exposure to 0.01% H_2O_2 potentiated ISBcen20 activity: only one of the seven derivatives tested had the same IS profile as wild-type CZ1238 (Fig. 3A). Overall, in addition to the wild-type IS profile, three new IS profiles were detected among the seven CZ1238 derivatives examined (Fig. 3A). The IS movement triggered by exposure to H_2O_2 was also reflected in changes to the macrorestriction profile obtained by

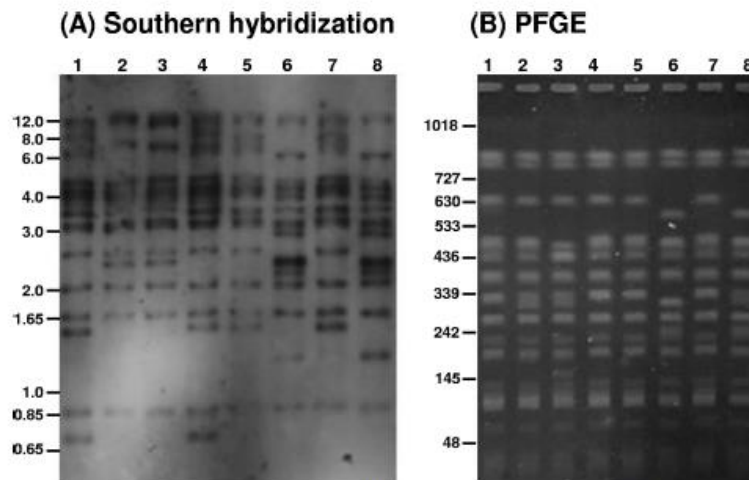


FIG. 3. Southern hybridization with an ISBcen20 probe (A) and PFGE (B) of seven individual colonies (lanes 1 to 7, respectively) of ST-32 strain CZ1238 exposed to 0.01% H_2O_2 . Lane 8, unexposed CZ1238. (A) Profiles in lanes 1 and 4, lanes 2 and 3, lanes 5 and 7, and lanes 6 and 8 match each other completely. The approximate positions of the molecular size markers (in kilobases) from the agarose gel electrophoresis of the DNA for the Southern hybridization are shown on the left. (B) Profiles in lanes 1, 4, 5, and 7 match each other completely. The positions and sizes (in kilobases) of the markers run for PFGE are shown on the left.

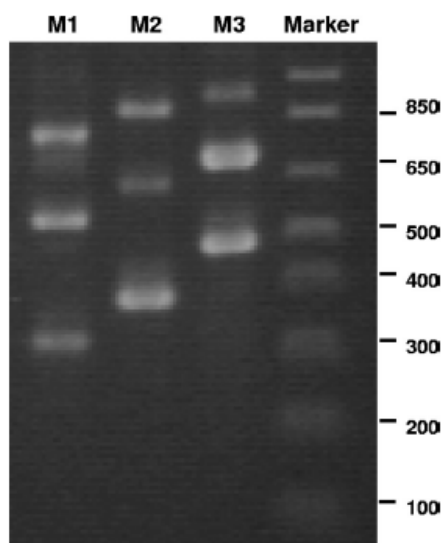


FIG. 4. PCR detection of the nine ISBcen20 copies present in *B. cenocepacia* strain J2315. Lanes M1 to M3 represent multiplex PCRs, each identifying three IS copies with different insertion points within the genome. Marker, 1-kb molecular size marker. Fragments of relevant sizes (in base pairs) are indicated on the right.

PFGE analysis: four different profiles differing by as many as five bands were detected among the seven CZ1238 derivatives (Fig. 3B). Although four of the seven colonies studied shared the same PFGE profile, none of the PFGE patterns corresponded exactly to that of the parental strain (Fig. 3B).

Movement of ISBcen20 in *B. cenocepacia* ST-28. The results for the Czech epidemic strain CZ1238 prompted the study of IS behavior in the genome-sequenced epidemic *B. cenocepacia* strain J2315 (7). The availability of genome sequence information made it possible to follow transposition events for every single ISBcen20 copy in the genome. To detect all nine ISBcen20 copies and to determine the frequency of their transposition via a cut-and-paste mechanism, we designed a set of three multiplex PCRs that amplified a product of a slightly different size for each IS insertion point (Table 1; Fig. 4). This approach was used to screen 96 colonies of J2315 derived from a culture exposed to 0.1% H₂O₂. In contrast to those from strain CZ1, all the J2315 colonies tested possessed each of the nine copies of ISBcen20 at the original insertion points derived from genome sequence analysis. To check if other possible transposition mechanisms (undetectable by PCR) and any genomic rearrangements had occurred under our experimental conditions, seven random colonies of J2315 were further analyzed by PFGE and ISBcen20 hybridization profiling. Neither method displayed any visible changes in the genomes of the colonies derived, indicating an absence of oxidative-stress-primed ISBcen20 activity in *B. cenocepacia* strain J2315 (data not shown).

DISCUSSION

The molecular typing anomalies described previously for *B. cenocepacia* strain CZ1 (ST-32) raised the question of the basis

for the extensive genomic rearrangements within a single strain (6). We have demonstrated that the reason may lie in the diversity and activity of the large number of IS elements present in the *Burkholderia* genome. Based on the data available from the sequenced genome of *B. cenocepacia* strain J2315 (ST-28), which is closely related to strain CZ1, we selected the four IS elements that have the highest copy numbers in J2315 and tested the CZ1 genome for the presence of homologues. ISBcen20 and ISBcen8 were found in all tested CF isolates of the CZ1 clone, with ISBcen20 in particular demonstrating substantial variability in its copy number and genomic distribution. Marked variation in the RFLP–Southern hybridization profiles of ST-32 isolates probed with ISBcen20 was also observed for other *B. cenocepacia* strains known to have caused multiple epidemic outbreaks (i.e., ST-28 [ET-12] and ST-234 [RAPD 04]) (14 strains). It was noteworthy that two of the seven ST-234 isolates tested did not possess an ISBcen20 homologue; whether this represents a loss or a gain of the IS element remains to be determined, but it does demonstrate the capacity for very rapid evolution in terms of the foreign DNA content in clonal strains of *B. cenocepacia*.

The significant changes in the copy number and insertion sites of ISBcen20 homologues observed in CF isolates of the same strain suggested that *in vivo* transposition activity of this element may occur. We hypothesized that the movement may be stimulated by oxidative stress, which is an inherent feature of the respiratory tract in cystic fibrosis patients; the subsequent demonstration of ISBcen20 movement mediated by oxidative stress in the Czech strain is highly novel in the context of both IS elements and CF microbial pathogens. A chronically inflamed CF lung is rich in ROS, which are produced by the host immune system in response to infection. CF pathogens have developed various ROS-protective mechanisms to enable successful colonization of the lung. For example, *B. cenocepacia* possesses antioxidant enzymes, such as superoxide dismutase, catalase, and catalase-peroxidase (9, 10), and recent microarray analysis has demonstrated induction of a hydroperoxide resistance protein in response to ROS (5). Although these enzymes allow bacteria to survive in the airways, they are unlikely to neutralize all ROS, which may therefore still affect some processes occurring in bacteria at molecular levels.

DNA analysis of individual CZ1 colonies exposed to oxidative stress clearly demonstrated that ISBcen20 has moved and very likely contributed to changes in the PFGE profiles of these derivatives. In contrast, ISBcen20 distribution, as well as PFGE fingerprints, remained unchanged in *B. cenocepacia* J2315, even though this strain was also capable of good growth under the same stress conditions as CZ1. All nine copies of ISBcen20 within the J2315 genome contain a frameshift mutation within the IS element's transposase (7). The bioinformatic annotation of J2315 suggests that this transposase may be expressed if a –1 ribosomal translational slippage (16) occurs at the mutation point within its coding sequence (5'-A AAAAC-3') (7). The lack of H₂O₂-induced movement of ISBcen20 in J2315 suggests that in fact this frameshift mutation in the transposase is a lethal mutation that cannot be overcome and that the ISBcen20 element is a pseudogene in this strain. These data also suggest that IS movement in response to oxidative stress is strain specific in *B. cenocepacia*,

and the degree of genomic stability may differ considerably between closely genetically related strains.

Heat shock has been shown to increase the frequencies of transposition of 8 different IS elements in an environmental isolate of *Burkholderia multivorans* (17); interestingly, oxidative stress did not stimulate IS activity in this *B. multivorans* strain. The lack of ISBcen20 movement in *B. cenocepacia* after heat shock suggests either that this element is unresponsive to this form of stress or that temperature is not a sufficiently stimulating factor for epidemic *B. cenocepacia* CF strains, which are well adapted to growth in human lungs. However, the demonstration that an IS element in *B. cenocepacia* can respond to oxidative stress, an inherent feature of the CF lung environment, is highly significant for other CF pathogens. It will be interesting to explore whether other *B. cepacia* complex species and even *Pseudomonas aeruginosa* (both of which have multiple IS elements) also possess this rapid form of evolution, which, if it alters virulence, could be responsible for the wide variation in clinical outcomes associated with microbial infection in CF.

PFGE has been employed as a gold-standard bacterial-typing technique for many bacterial pathogens. However, its usefulness for *B. cenocepacia* has not been unequivocal, especially when large populations of organisms are to be analyzed (3). Very high discriminatory power may be misleading in terms of correct determination of epidemiologic relatedness among isolates and may not cluster together those that actually belong to the same clone. This was the pitfall of our previous epidemiological analysis, where we had great difficulty interpreting the PFGE data obtained for Czech clinical isolates (6). The present study has documented that PFGE results for the ST-32 strain were affected by oxidative stress conditions and that PFGE pattern variability was very likely affected by the transposition activity of at least one insertion sequence within this *B. cenocepacia* strain. The fact that this activity could be detected after a few hours of growth in the presence of oxidative stress indicates the capacity of certain *B. cenocepacia* strains for rapid IS-mediated evolution.

It is noteworthy that our data demonstrated only an indirect link between ISBcen20 activity and the PFGE patterns obtained after exposure to oxygen radicals (Fig. 3). Although we observed substantial ISBcen20 movement following incubation in 0.01% H₂O₂, PFGE data derived from the same condition could not be considered to be altered specifically due to ISBcen20. In addition, pairs of CZ1238 colonies that showed different profiles by Southern hybridization (Fig. 3A) did not match those with changed patterns by PFGE (Fig. 3B). It is likely that multiple mobile elements were potentiated by oxidative stress and that their activity eventually led to changes in PFGE. ISBcen20 may be just one of the elements that can mediate changes in PFGE patterns through mechanisms of DNA rearrangement/recombination; it is unlikely that the straightforward self-insertion of a small IS can be detected directly by PFGE. Also, since ISBcen20 itself lacks a target sequence for the SpeI restriction enzyme used for PFGE analysis, the alterations detected by PFGE (Fig. 3) were most probably the result of large-scale genomic recombinations that occurred after the oxidative-stress-primed IS movements.

We conclude that ISBcen20 is an active mobile element in the epidemic *B. cenocepacia* ST-32 CF strain and that its ac-

tivity is inducible by reactive oxygen species. This mechanism represents a novel form of rapid evolution that *B. cenocepacia* may undertake during infection, and it will be very interesting to determine whether other CF pathogens that are rich in IS elements respond in the same way. The transposition activity of ISBcen20 very likely contributes to genomic rearrangements of the strain that are detected by PFGE analysis.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was funded by grants from the Wellcome Trust (075586) and the Ministry of Education of the Czech Republic (MSM0021620812).

REFERENCES

- Baldwin, A., E. Mahenthiralingam, P. Drevinek, P. Vandamme, J. R. Govan, D. J. Waine, J. J. LiPuma, L. Chiarini, C. Dalmastrì, D. A. Henry, D. P. Speert, D. Honeybourne, M. C. Maiden, and C. G. Dowson. 2007. Environmental *Burkholderia cepacia* complex isolates in human infections. *Emerg. Infect. Dis.* 13:458–461.
- Baldwin, A., E. Mahenthiralingam, K. M. Thickett, D. Honeybourne, M. C. Maiden, J. R. Govan, D. P. Speert, J. J. LiPuma, P. Vandamme, and C. G. Dowson. 2005. Multilocus sequence typing scheme that provides both species and strain differentiation for the *Burkholderia cepacia* complex. *J. Clin. Microbiol.* 43:4665–4673.
- Coenye, T., T. Spilker, A. Martin, and J. J. LiPuma. 2002. Comparative assessment of genotyping methods for epidemiologic study of *Burkholderia cepacia* genomovar III. *J. Clin. Microbiol.* 40:3300–3307.
- Diaz, P. I., N. Slakeski, E. C. Reynolds, R. Morona, A. H. Rogers, and P. E. Kolenbrander. 2006. Role of *oxyR* in the oral anaerobe *Porphyromonas gingivalis*. *J. Bacteriol.* 188:2454–2462.
- Drevinek, P., M. T. Holden, Z. Ge, A. M. Jones, I. Ketchell, R. T. Gill, and E. Mahenthiralingam. 2008. Gene expression changes linked to antimicrobial resistance, oxidative stress, iron depletion and retained motility are observed when *Burkholderia cenocepacia* grows in cystic fibrosis sputum. *BMC Infect. Dis.* 8:121.
- Drevinek, P., S. Vosahlikova, O. Cinek, V. Vavrova, J. Bartosova, P. Pohnunek, and E. Mahenthiralingam. 2005. Widespread clone of *Burkholderia cenocepacia* in cystic fibrosis patients in the Czech Republic. *J. Med. Microbiol.* 54:655–659.
- Holden, M. T., H. M. Seth-Smith, L. C. Crossman, M. Sebahia, S. D. Bentley, A. M. Cerdeno-Tarraga, N. R. Thomson, N. Bason, M. A. Quail, S. Sharp, I. Cherevach, C. Churcher, I. Goodhead, H. Hauser, N. Holroyd, K. Mungall, P. Scott, D. Walker, B. White, H. Rose, P. Iversen, D. Mil-Homens, E. P. Rocha, A. M. Fialho, A. Baldwin, C. Dowson, B. G. Barrell, J. R. Govan, P. Vandamme, C. A. Hart, E. Mahenthiralingam, and J. Parkhill. 2009. The genome of *Burkholderia cenocepacia* J2315, an epidemic pathogen of cystic fibrosis patients. *J. Bacteriol.* 191:261–277.
- Ives, H., R. Horak, and M. Kivisaar. 2001. Involvement of sigma(S) in starvation-induced transposition of *Pseudomonas putida* transposon Tn4652. *J. Bacteriol.* 183:5445–5448.
- Keith, K. E., and M. A. Valvano. 2007. Characterization of SodC, a periplasmic superoxide dismutase from *Burkholderia cenocepacia*. *Infect. Immun.* 75:2451–2460.
- Lefebvre, M., and M. Valvano. 2001. In vitro resistance of *Burkholderia cepacia* complex isolates to reactive oxygen species in relation to catalase and superoxide dismutase production. *Microbiology* 147:97–109.
- Lessie, T. G., W. Hendrickson, B. D. Manning, and R. Devereux. 1996. Genomic complexity and plasticity of *Burkholderia cepacia*. *FEMS Microbiol. Lett.* 144:117–128.
- Mahenthiralingam, E., A. Baldwin, and C. G. Dowson. 2008. *Burkholderia cepacia* complex bacteria: opportunistic pathogens with important natural biology. *J. Appl. Microbiol.* 104:1539–1551.
- Mahenthiralingam, E., A. Baldwin, P. Drevinek, E. Vanlaere, P. Vandamme, J. J. LiPuma, and C. G. Dowson. 2006. Multilocus sequence typing breathes life into a microbial metagenome. *PLoS One* 1:e17.
- Mahenthiralingam, E., M. E. Campbell, D. A. Henry, and D. P. Speert. 1996. Epidemiology of *Burkholderia cepacia* infection in patients with cystic fibrosis: analysis by randomly amplified polymorphic DNA fingerprinting. *J. Clin. Microbiol.* 34:2914–2920.
- Mahenthiralingam, E., T. A. Urban, and J. B. Goldberg. 2005. The multifarious, multireplicon *Burkholderia cepacia* complex. *Nat. Rev. Microbiol.* 3:144–156.
- Mahillon, J., and M. Chandler. 1998. Insertion sequences. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62:725–774.
- Ohtsubo, Y., H. Genka, H. Komatsu, Y. Nagata, and M. Tsuda. 2005. High-temperature-induced transposition of insertion elements in *Burkholderia multivorans* ATCC 17616. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:1822–1828.

18. O'Sullivan, L. A., A. J. Weightman, T. H. Jones, A. M. Marchbank, J. M. Tiedje, and E. Mahenthalingam. 2007. Identifying the genetic basis of ecologically and biotechnologically useful functions of the bacterium *Burkholderia vietnamiensis*. *Environ. Microbiol.* **9**:1017–1034.
19. Speert, D. P., D. Henry, P. Vandamme, M. Corey, and E. Mahenthalingam. 2002. Epidemiology of *Burkholderia cepacia* complex in patients with cystic fibrosis, Canada. *Emerg. Infect. Dis.* **8**:181–187.
20. Sun, L., R. Z. Jiang, S. Steinbach, A. Holmes, C. Campanelli, J. Forstner, U. Sajjan, Y. Tan, M. Riley, and R. Goldstein. 1995. The emergence of a highly transmissible lineage of *cbl⁺ Pseudomonas (Burkholderia) cepacia* causing CF centre epidemics in North America and Britain. *Nat. Med.* **1**:661–666.
21. Vanlaere, E., A. Baldwin, D. Gevers, D. Henry, E. De Brandt, J. J. Lipuma, E. Mahenthalingam, D. P. Speert, C. Dowson, and P. Vandamme. 2009. Taxon K, a complex within the *Burkholderia cepacia* complex, comprises at least two novel species, *Burkholderia contaminans* sp. nov. and *Burkholderia lata* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **59**:102–111.
22. Vanlaere, E., J. J. Lipuma, A. Baldwin, D. Henry, E. De Brandt, E. Mahenthalingam, D. Speert, C. Dowson, and P. Vandamme. 2008. *Burkholderia latens* sp. nov., *Burkholderia diffusa* sp. nov., *Burkholderia arboris* sp. nov., *Burkholderia seminalis* sp. nov. and *Burkholderia metallica* sp. nov., novel species within the *Burkholderia cepacia* complex. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **58**:1580–1590.