

**Univerzita Karlova v Praze**

**2. lékařská fakulta**

Autoreferát dizertační práce



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

**RNDr. Šárka Vošahlíková**

Praha (2014)

***Vnitřní strana obálky:***

**Doktorské studijní programy v biomedicíně**

*Univerzita Karlova v Praze a Akademie věd České republiky*

Obor: Molekulární a buněčná biologie, genetiky a virologie

Předseda oborové rady: Prof. RNDr. Stanislav Zdražil, DrSc.

Školící pracoviště: Laboratoř molekulární genetiky, 2. lékařská fakulta,  
Univerzita Karlova v Praze  
Laboratoř bakteriální genetiky, Centrum epidemiologie  
a mikrobiologie, Státní Zdravotní Ústav, Praha

Autor: RNDr. Šárka Vošahlíková

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

Oponenti:

Autoreferát byl rozeslán dne:

Obhajoba se koná dne: .....v .....hod.

kde: .....

S dizertační prací je možno se seznámit na děkanátu

2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze.

## Obsah

2.	<b>ABSTRAKT</b> .....	4
3.	<b>ABSTRACT</b> .....	5
4.	<b>ÚVOD</b> .....	6
4.1.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	6
4.1.1.	Klinický průběh infekce <i>P. aeruginosa</i> u pacientů s CF .....	6
4.2.	Komplex <i>Burkholderia cepacia</i> .....	7
4.2.1.	Klasifikace bakterií komplexu <i>B. cepacia</i> .....	7
4.2.2.	Epidemiologie komplexu <i>B. cepacia</i> .....	8
4.2.3.	Genom komplexu <i>B. cepacia</i> .....	8
5.1.	Metody detekce a typizace bakteriálních patogenů .....	8
6.1.	Situace v pražském centru pro léčbu CF a diagnostika komplexu <i>B. cepacia</i> a <i>P. aeruginosa</i> .....	9
5.	<b>CÍLE</b> .....	11
6.	<b>MATERIÁLY A METODY</b> .....	12
7.	<b>VÝSLEDKY</b> .....	13
8.	<b>DISKUZE</b> .....	17
9.	<b>ZÁVĚR</b> .....	21
10.	<b>POUŽITÁ LITERATURA</b> .....	23

## 2. ABSTRAKT

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 cytoplazmatickou membránu. Přestože tato porucha zasahuje různé orgány, je postižení dýchacího systému tím nejzávažnějším. Porušením iontové rovnováhy dochází v dýchacích cestách k tvorbě hustého a vazkého hlenu, který brání odstraňování 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. Nejvýznamnějšími původci těchto infekcí jsou *Pseudomonas aeruginosa* a bakterie komplexu *Burkholderia cepacia* (*Bcc*). Chronické infekce způsobené těmito mikroorganismy jsou prakticky nevyléčitelné. Situaci u infekcí způsobených těmito bakteriemi komplikuje výskyt epidemických kmenů, jež se přenáší mezi pacienty. Prevence šíření infekcí u pacientů s CF závisí na přesné a včasné 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 záchyt vysoce epidemického kmene *Burkholderia cenocepacia* CZ1 v české populaci pacientů s CF (Drevinek P. et al., 2005).

### 3. ABSTRACT

Cystic fibrosis is the most abundant inherited autosomal recessive disease in Caucasian population. Cystic fibrosis is caused by a dysfunction of a transport channel which is responsible for the 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's life and thus are the most common causes of the respiratory failure and premature death. The most important agents causing these infections are *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia* (*Bcc*). Infections caused by those 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 prevalence of the highly epidemic strain of *Burkholderia cenocepacia* CZ1 in the population of the cystic fibrosis patients in Czech Republic (Drevinek P. et al., 2005).

## 4. Úvod

Cystická fibróza (CF) je jedním z nejčastějších vrozených autozomálně recesivních onemocnění, které se v kavkazské populaci vyskytuje s frekvencí jednoho postiženého na 3000 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). Mutací v genu dochází k poruše nebo úplné dysfunkci proteinového kanálu, a tím ke zvýšenému influxu sodných iontů a vzniku relativní nepropustnosti pro chloridové ionty (Roomans G.M., 2014). Cystická fibróza postihuje všechny tělní systémy s výjimkou centrálního nervového systému. Nejzávažněji bývá postižen dýchací systém pacientů.

V důsledku narušeného transportu iontů dochází k poruše samočistící funkce sliznice a vzniku vazkého, hustého hlenu, který je následně příčinou obstrukce dýchacích cest. Díky tomu se prostředí dýchacích cest stává ideálním místem pro rozvoj bakteriálních infekcí, které lze jen s obtížemi účinně léčit (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. 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*, *Pandoraea* 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).

### 4.1. *Pseudomonas aeruginosa*

*P. aeruginosa* je gramnegativní, nesporulující, pohyblivá bakterie, v přírodě značně rozšířená. 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. *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.

#### 4.1.1. Klinický průběh infekce *P. aeruginosa* u pacientů s CF

U pacientů s CF infekce způsobené *P. aeruginosa* zásadně zhoršují prognózu onemocnění. 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 časné a intermitentní infekce 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, vzniku mukoidních variant kolonizujících kmenů a rozvoji chronické infekce.

#### **4.1.2. 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. Koncem minulého století se začaly objevovat práce o přenosných, vysoce infekčních kmenech, které jsou asociovány s výraznější antibiotickou rezistencí a horším průběhem onemocnění (Armstrong D. et al., 2003; Jones A.M. et al., 2001; Al-Aloul M. et al., 2004; Griffiths A.L. et al., 2005).

S výskytem epidemických kmenů řada center pro léčbu CF zavedla přísný systém odděleného sledování pacientů podle jejich mikrobiologického nálezu, 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.

### **4.2 Komplex *Burkholderia cepacia***

Nejzávažnějšími a nejobávanějšími původci bakteriálních infekcí u CF jsou bakterie komplexu *Burkholderia cepacia* (*Bcc*). Tento komplex zahrnuje 18 validně pojmenovaných druhů. 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). 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).

#### **4.2.1. 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 S rozvojem molekulárně genetických technik byl *Bcc* postupně rozšířen na současných 18 druhů.

#### **4.2.2. 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 zahrnuje nejvíce známých epidemických kmenů (Drevinek P. et al., 2005; Speert D.P. et al., 2002; Coenye T. et al., 2002). Nejznámějším kmenem tohoto druhu je *B. cenocepacia* ET12 (*B. cenocepacia* Electrophoretic Type 12). ET12 zahrnuje 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 druhu *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). Spadá sem i epidemický kmen CZ1 popsáný v České republice (Drevinek P. et al., 2005). Na druhou stranu jsou popsány epidemické kmeny i u dalších druhů v rámci *Bcc* jako jsou *B. multivorans* (Baldwin A. et al., 2008; Govan J.R. et al., 2007), *B. cepacia* a *B. contaminans* (Martina P. et al., 2013; Medina-Pascual M.J. et al., 2012).

#### **4.2.3. Genom komplexu *B. cepacia***

Bakterie *Bcc* mají velmi plastický genom netypický pro prokaryotní organizmy. 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). Tyto genomické ostrovy obsahují celou řadu inzerčních sekvencí (IS). Sekvenační analýzou bylo v genomu J2315 nalezeno 22 různých IS, kdy čtyři z nich 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 mají i přes svou jednoduchost, schopnost podporovat genomické přeskupování a mohou ovlivnit transkripční aktivitu některých genů (Wood M.S. et al., 1991; Miche L. et al., 2001). Předpokládá se, že asociace IS s určitými geny může mít za následek zvýšené riziko přenosu a virulence daného kmene *Bcc*.

### **5.1. 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. Vhodná typizační metoda musí mít vysokou rozlišovací schopnost, dostatečnou reprodukovatelnost, 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. Vzhledem k časové náročnosti a nedostatečné rozlišovací schopnosti většiny fenotypových metod došlo v posledních desetiletích k velkému rozvoji metod genotypizačních, které umožňují u každého izolátu určit genotypový profil (např. elektroforetický fingerprint nebo sekvenční typ) a tím 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. Do této skupiny patří makrorestrikční analýza DNA s následnou separací fragmentů v pulzním elektrickém poli (*Pulsed Field Gel Electrophoresis* – PFGE), metoda polymorfismu délky restrikčních fragmentů (*Restriction Fragment Length Polymorphism* – RFLP), metoda amplifikace polymorfních úseků DNA (*Random Amplified Polymorphic DNA assay* – RAPD), Rep – PCR (*Repetitive sequence – based Polymerase Chain Reaction*), BOX – PCR (*BOX Polymerase Chain Reaction*) a ERIC – PCR (*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus Polymerase Chain Reaction*). Kombinaci štěpení DNA restrikčními endonukleázami a selektivní amplifikací vybraných fragmentů využívá polymorfismus délky amplifikovaných fragmentů (*Amplified Fragments Length Polymorphism* – AFLP).

Druhou skupinu tvoří metody založené na sekvenaci DNA. Tyto metody můžeme dále dle principu rozdělit na tradiční Sangerovo sekvenování a sekvenování nové generace (Next generation sequencing).

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. Na základě velikosti a počtu DNA fragmentů na nosiči můžeme tyto sestavy rozlišit na makro- a mikroarraye.

## **6.1. Situace v pražském centru pro léčbu CF a diagnostika komplexu *B. cepacia* a *P. aeruginosa***

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

Kultivační diagnostika bakterií *Bcc* založená na využití selektivního agaru BCSA (*Burkholderia cepacia* selective agar) byla zavedena v tomto centru v roce 1994. Díky tomu bylo zjištěno, že bakterie, v té době označovaná ještě jako *Pseudomonas cepacia*, je přítomna zhruba u 20 % všech pacientů s CF. V roce 2001 byla mezi rutinní analýzy implementována molekulárně genetická diagnostika z klinického materiálu založená na polymerázové řetězové reakci (*Polymerase chain reaction* – PCR) amplifikující gen *recA*. Kromě přímé detekce bakterií *Bcc* byly zavedeny i specifické PCR reakce, které umožňují následnou identifikaci genomů. S narůstajícím počtem

druhů *Bcc* a zavedením metody MLST do rutinního provozu však pozbyly tyto druhově specifické PCR metody významu.

Na základě vysoké prevalence infekce mezi českými pacienty byla na začátku tohoto století provedena studie, která odhalila, že původci většiny infekcí způsobených bakteriemi *Bcc* náleží k druhu *B. cenocepacia* (Drevinek P. et al., 2005). Následně bylo zjištěno, že v české populaci pacientů s CF cirkuluje epidemický kmen, který byl označen jako CZ1 (ST 32) – viz výše. Toto zjištění vedlo ke zpřísnění a důslednému dodržování segregáčních a protiepidemických opatření.

Tento kmen je příbuzný s již dříve popsáním epidemickým kmenem ET12 (Drevinek P. et al., 2005). Přestože kmene ET12 (ST 28) a CZ1 (ST 32) jsou úzce příbuzné, 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)

Podobně jako v ostatních centrech pro CF je za vysoké procento infekcí pacientů v pražském centru zodpovědná *P. aeruginosa*. Diagnostický průkaz tohoto patogenu je v současné době založen na jeho amplifikaci na klasických kultivačních půdách. Na přelomu let 2003 a 2004 byl tento kultivační průkaz doplněn o přímou molekulárně – genetickou detekci patogenu v klinickém materiálu. Podstatou této metody je nested PCR založené na detekci genu pro lipoprotein vnější membrány – *oprL*. Tato metoda však neposkytovala spolehlivé výsledky a základem diagnostiky tedy i nadále zůstalo pravidelné kultivační vyšetření. 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.

## 5. Cíle

- Analýza původců infekcí pacientů pražského centra pro léčbu cystické fibrózy se zaměřením na přítomnost epidemických kmenů *P. aeruginosa* s využitím celogenomové genotypizační techniky s vysokou rozlišovací účinností.
- Identifikace bakteriálních izolátů *Bcc*, získaných z klinického materiálu pacientů s CF, metodou multilokusové sekvenční typizace (MLST) až na úroveň kmene bez nutnosti kultivačního záchytu.
- 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.
  - Aplikace vybraných stresových podmínek za účelem prokázání přeskupování IS v genomu CZ1 – 1238 a ET12 – J2315.
  - Detekce možných přemisťování *ISBcen20* mechanismem „cut and paste“ v genomu vybraného izolátu ET12 metodou multiplex – PCR.

## 6. Materiály a metody

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

Druhá identifikace izolátů *P. aeruginosa* byla provedena pomocí API20NE systému (BioMerieux, Francie) a následně potvrzena pomocí metody 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)). Stanovení klonální vazby mezi jednotlivými izoláty *P. aeruginosa* bylo provedeno pomocí genotypizačních metod AFLP a makrorestrikční analýzy (*SpeI*).

### Identifikace a typizace bakterií komplexu *B. cepacia* pomocí MLST z klinického materiálu pacientů s CF bez nutnosti kultivačního záchytu

Pro nested uspořádání MLST prováděné z klinického materiálu byla vyizolována DNA pomocí kitu Amplicor Respiratory Specimen Extraction kit (Roche). Identifikace a typizace bakteriálních kmenů byla provedena pomocí modifikovaného protokolu MLST *Bcc* (Baldwin A. et al., 2005, Spilker T. et al., 2009), který byl přepracován do nested PCR formátu.

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

Pro stanovení přítomnosti a rozmístění IS pomocí RFLP a Southern hybridizace, byla využita genomová DNA získaná extrakcí pomocí skleněných kuliček (Mahenthiralingam E. et al., 1996). Pohyb vybrané IS – *ISBcen20* navozený aplikací stresových podmínek byl vyvolán vystavením kolonií kmene CZ1 a J2315 – sérii sedmi pasáží, tepelnému šoku a růstu v subinhibiční 0,01% a 0,1% koncentraci peroxidu vodíku. Následná analýza získaných izolátů byla provedena pomocí makrorestrikční analýzy (*SpeI*) dle dříve publikovaného protokolu (Drevinek P. et al., 2005). Detekce všech devíti kopií *ISBcen20* a jejich možného přemisťování mechanismem „cut and paste“ v genomu J2315 byla provedena pomocí univerzálního forward primeru v kombinaci s jedním z reverzních primerů, které byly specifické pro jednotlivé *ISBcen20*. Primery byly navrženy pro možnou detekci IS pomocí multiplex PCR. DNA pro tuto analýzu byla získána izolací pomocí 5%chelexu (BioRad, USA).

## 7. Výsledky

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

Studie byla provedena na vzorcích sputa získaných od 69 pacientů představujících většinu (80 %) pacientů kolonizovaných *P. aeruginosa*, kteří byli v dané době léčeni v pražském centru pro léčbu CF.

Příbuznost jednotlivých izolátů byla posouzena na základě výsledků získaných metodou AFLP. Na zvolené 85% hladině podobnosti bylo rozlišeno 44 izolátů s unikátním profilem a devět shluků označených 1–9, které obsahovaly dva až pět izolátů. Vysoká rozmanitost genotypů v 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.

Celkem 64 z 69 izolátů *P. aeruginosa* studovaných metodou AFLP bylo analyzováno též pomocí makrorestrikční analýzy. Výsledky této analýzy potvrdily vysokou genotypovou rozmanitost těchto izolátů. Většina profilů se navzájem lišila ve více než šesti prouzcích, což při aplikaci kritérií podle Tenovera et al. (1995) vylučuje bezprostřední epidemiologickou vazbu. Oproti tomu izoláty, které tvořily shluk podle výsledků získaných metodou 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 vyšetřených dříve. 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.

Vyšetření citlivosti 69 studovaných izolátů na vybraná antibiotika ukázalo nízký výskyt rezistence k antimikrobním látkám, jež jsou primárně účinné na *P. aeruginosa*. Tři čtvrtiny izolátů byly plně citlivé ke všem použitým antibiotikům. Nejčastěji se vyskytla rezistence k ciprofloxacinu a gentamicinu. Pouze šest izolátů bylo multirezistentních, a jen dva izoláty byly rezistentní k zástupcům tří skupin antibiotik. Žádný kmen nebyl rezistentní ke kolistinu, který je v současnosti nejúčinnější v klinické praxi používanou látkou určenou k léčbě infekcí vyvolaných multirezistentními kmeny *P. aeruginosa*.

### Identifikace a typizace bakterií komplexu *B. cepacia* pomocí MLST z klinického materiálu pacientů s CF bez nutnosti kultivačního záchytu

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) při FN a 2. LF Motol využíván detekční postup, který by umožňoval přiřazení izolátu k jakémukoli druhu v rámci komplexu. Zavedli jsme tedy metodu nested PCR amplifikace a sekvenace MLST. Výhodou využití této metody k detekci a typizaci *Bcc* je i vysoká citlivost, která umožňuje zachytit minimálního množství bakterie ve vzorku, a tím odhalení infekce v době, kdy není možné kultivačními technikami přítomnost bakterie prokázat. Modifikací původního protokolu pro MLST *Bcc* (Baldwin A. et al., 2005, Spilker T. et al., 2009) do nested PCR formátu bylo dosaženo stejné citlivosti metody MLST, jako u dříve publikovaného a rutinně využívaného dvoukolového nested – PCR (Drevinek P. et al., 2002).

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*).

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. 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*.

Omezení využití metody MLST k detekci přímo z klinického materiálu představovala možná interakce primerů s DNA jiného původu než s DNA bakterií z *Bcc*, která je v klinickém materiálu přítomná. Výsledky sekvenací však jednoznačně ukazují, že použité primery neinteragují ani s lidskou DNA ani s DNA ostatních bakterií, které nenáleží do *Bcc*.

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

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 vykazují značnou variabilitu. Předpokládali jsme, že rozmanitost profilů může být zapříčiněna genomickými přestavbami způsobenými přeskupováním IS. Sekvenční analýza kmene J2315 prokázala přítomnost minimálně 22 IS, z nichž čtyři jsou přítomné ve více kopiích. Již dříve bylo publikováno, že stresové faktory, jako je vysoká teplota nebo hladovění, mají dopad na zvýšené přemístování 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 přítomnosti reaktivních forem kyslíku.

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

Pro stanovení přítomnosti vybraných IS, bylo pomocí metody RFLP a Southern hybridizace analyzováno celkem 14 izolátů CZ1 (ST 32) získaných od různých českých pacientů s CF. 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, respektive v případě *ISBcen8* 6 až 12 kopií na genom. Při porovnání jednotlivých profilů získaných pomocí metody RFLP s následnou Southern hybridizací byla u *ISBcen20* pozorována vysoká variabilita – pouze šest izolátů vykazovalo více než 50% podobnost. Porovnáním RFLP profilů pro *ISBcen8* na stejné hladině podobnosti byla situace odlišná. Většina (11 ze 14 izolátů) měla více jak polovinu shodně umístěných proužků. Ze získaných výsledků vyplývá, že inzerční homolog *ISBcen20* u izolátů CZ1 je mnohem aktivnější a vykazuje rychlý vývoj přeskupování a změn v počtu kopií. Kromě CZ1 byly testovány i izoláty jiných kmenů *B. cenocepacia*. Jednalo 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*.

Další studium bylo zaměřeno, vzhledem ke zjištěnému variabilnímu počtu i rozmístění, na *ISBcen20*, která může přispívat k rychlým genomickým přestavbám viditelným v makrorestrikčních profilech (Drevinek P. et al., 2005). Přemísťování *ISBcen20* vlivem použitých stresových podmínek byla sledováno na reprezentativním vzorku CZ1–1238. Jednotlivé kolonie byly postupně vystaveny sérii sedmi pasáží, tepelnému šoku a růstu v subinhibiční 0,01% koncentraci peroxidu vodíku. V případě sériového pasážování a expozice teplotnímu šoku nebyly pozorovány žádné změny v intragenomickém přeskupování *ISBcen20*. Naproti tomu, při vystavení kultury prostředí 0,01% peroxidu vodíku, bylo jasné a detekovatelné přeskupování *ISBcen20*. V případě RFLP analýzy měl pouze jeden ze sedmi testovaných izolátů shodný profil s původním izolátem CZ1–1238. PFGE analýzou byly získány čtyři rozdílné makrorestrikční profily, které se lišily ve více než pěti pruzích. U čtyř analyzovaných izolátů byl zjištěn shodný makrorestrikční profil. Žádný ze získaných profilů nebyl shodný s profilem původního izolátu CZ1–1238.

Posledním dílčím úkolem této práce byla detekce *ISBcen20* a stanovení frekvence jejího přemísťování mechanismem „cut and paste“ v genomu kmene *B. cenocepacia* J2315. 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 přemísťování. Pro možné přemísťování 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 oxidačního stresu v subinhibičním prostředí peroxidu.



## 8. Diskuze

### 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). V dospělosti je tímto patogenem infikováno až 80 % nemocných s CF. Většina izolátů pocházejících 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 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; 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; Fothergill J.L. et al., 2012). Vzhledem k vysoké prevalenci infekce *P. aeruginosa* v pražském centru pro léčbu CF byla provedena podrobná analýza izolátů této bakterie 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*. Naše výsledky tak ukázaly vysokou genetickou diverzitu studované populace *P. aeruginosa* a to, že pacienti byli infikováni vesměs jedinečnými kmeny z prostředí. Námi získané výsledky ale reflektují pouze epidemiologickou situaci kmenů *P. aeruginosa* získaných od pacientů pražského centra pro léčbu CF. Později Nemcem a kolegy 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 odhalila, že převážná většina testovaných multirezistentních izolátů (82 %) *P. aeruginosa* náleží ke třem epidemickým klonům, které byly zjištěny i v dalších populacích pacientů jednotek intenzivní péče (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 virulencních 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 probíhat rychlá (mikroevoluční) diverzifikace, jež vede ke vzniku řady subtypů (Mowat E. et al., 2011; Carter M.E. et al., 2010; Bezuidt O.K. et al., 2013). 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. bakterií kontaminované vnější prostředí a 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, rozšíření epidemického kmene *B. cenocepacia* CZ1. I když příčiny rozdílů v epidemiologii obou bakterií nejsou známe, 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).

#### Identifikace a typizace bakterií komplexu *B. cepacia* z klinického materiálu pacientů s CF pomocí metody MLST bez nutnosti kultivačního záchytu

Vzhledem k výraznému negativnímu ovlivnění celkového stavu a dlouhodobé prognózy pacientů s CF v důsledku infekce *Bcc* je včasná diagnostika a identifikace původce zcela zásadní. Druhově specifické PCR metody se ukazují jako nedostačující vzhledem k narůstajícímu počtu druhů *Bcc*, a 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).

Přímá detekce a identifikace pomocí metody MLST se ukázala jako vhodný nástroj pro identifikaci a typizaci kmenů *Bcc* přímo z klinického materiálu pacientů s CF. Pomocí nově navrženého schématu metody MLST byly správně až na úroveň kmene identifikovány všechny testované kmeny, včetně čtyř, které se pomocí dosud využívaného schématu zaměřeného na gen *recA*, nepodařilo opakovaně určit. Tyto kmeny byly metodou 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. Využitím obecných namísto druhově specifických primerů společně se sekvenací ampliconů umožňuje metoda MLST identifikovat všechny izoláty *Bcc* na kmenovou úroveň, a rozpoznat tak i izoláty s nejasným taxonomickým zařazením. Zároveň

umožňuje tvorbu přírůstkových on-line databází (<http://pubmlst.org/bcc/>), v nichž jsou uloženy všechny známé varianty analyzovaných alel, a které umožňují mezilaboratorní analýzy i provádění globálních epidemiologických studií. Další nespornou výhodou zavedené metody je možnost identifikace smíšených populací. 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 metoda MLST. V takových případech může tato metoda, ve které se k analýze 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.

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

Příčinou rozmanitosti PFGE profilů u izolátů *B. cenocepacia* CZ1 mohou být přestavby genomu vznikající v důsledku aktivního přemístování IS (Miche L. et al., 2001). Posledním z cílů 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*. Dle zjištěných výsledků jsme předpokládali, že transpoziční aktivita této IS může být experimentálně vyvolána *in vitro* a přemístování IS může být stimulováno oxidačním stresem, který je typický pro prostředí dýchacích cest u pacientů s CF. 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 než jedné čtvrtiny genů a k zvýšené expresi virulenčních faktorů (Sass A.M. et al., 2013). Analýza DNA 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 strukturním reorganizacím genomu, přestože tyto izoláty byly vystaveny stejným stresovým podmínkám jako kmen CZ1. Všech devět kopií *ISBcen20* přítomných u J2315 obsahuje mutaci vzniklou 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.

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 zjištění, že izoláty českého kmene CZ1 reagují na podmínky oxidačního stresu, který simuluje plicní prostředí pacienta s CF, je významné pro studium dalších patogenů u pacientů s 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). 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 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.

## 9. 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 pozitivivity

- 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 popsané 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 zjistitelné 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.

## 10. Použitá literatura

- Aaron, S. D., Vandemheen, K. L., Ramotar, K., Giesbrecht-Lewis, T., Tullis, E., Freitag, A., Paterson, N., Jackson, M., Lougheed, 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.
- 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.
- Baldwin, A., Mahenthalingam, E., Drevinek, P., Pope, C., Waive, 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., Mahenthalingam, E., Drevinek, P., Vandamme, P., Govan, J. R., Waive, 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.
- 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). Intracolonial genome diversity of *Pseudomonas aeruginosa* clones CHA and TB. *BMC Genomics*, 14, 416.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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., Mahenthalingam, 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., Mahenthalingam, 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  $\beta$  - lactamase in Warsaw, Poland: further evidence for an international clonal complex. *J. Clin. Microbiol.* 45, 2829 - 2834.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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., 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.
- 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.
- 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.



- 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.
- 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., Vandamme, P. (2005).** Taxonomy and pathogenesis of the *Burkholderia cepacia* complex. *Chron Respir Dis*, 2(4), 209-217.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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., 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.
- 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.
- 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.

- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.

## CURRICULUM VITAE

**Jméno:** Šárka

**Příjmení:** Vošahlíková

**Narozena:** 6. 5. 1981 v Příbrami

**Stav:** svobodná, bezdětná

**Trvalé bydliště:** Čechovská 69, Příbram VIII, 26101

### Dosažené vzdělání:

**2005-doposud:** Doktorské studium na 2. lékařské fakultě Univerzity Karlovy v Praze. Dizertační práce na téma „Molekulární epidemiologie a vlastnosti bakteriálních původců infekcí plic u pacientů s cystickou fibrózou“ vypracována v Laboratoři molekulární genetiky 2. LF a FN v Motole a v Laboratoři bakteriální genetiky Centra epidemiologie a mikrobiologie na Státním Zdravotním Ústavu pod vedením doc. MUDr. Ondřeje Cinka, Ph.D. a doc. RNDr. Alexandra Nemce, Ph.D. Datum složení rigorózní zkoušky 27. 5. 2009.

**2001-2005:** Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze, obor – biologie odborná, specializace Molekulární biologie, genetika a mikrobiologie (datum obhajoby DP a státní závěrečné zkoušky: 31. 5. 2005 a 1. 6. 2005). Diplomová práce na téma „Identifikace epidemických kmenů *Burkholderia cenocepacia* v populaci pacientů s cystickou fibrózou“ vypracována v Laboratoři molekulární genetiky 2. LF a FN v Motole, pod vedením doc. MUDr. Ondřeje Cinka, Ph.D.

**1996-2000:** Střední zdravotnická škola Alšovo nábřeží, obor farmaceutický laborant

### Zaměstnání:

**1/2014-doposud:** SOTIO a.s., výzkumný pracovník

**1/2013-12/2013:** SOTIO a.s., specialista jištění jakosti

**1/2010-12/2012:** Česká genetická banka spol. s.r.o.

**2/2005-12/2009:** Laboratoř molekulární genetiky, Pediatrická klinika, 2. LF a FN v Motole

### Odborné zahraniční stáže:

**11/2011:** Pracovní pobyt v Cord Blood Bank NHS Bristol, UK

**7/2007-8/2007:** Laboratoř v Cardiff School of Biosciences, Wales, Velká Británie. Vedoucí laboratoře E. Mahenthalingam, PhD. Cíl stáže: Studium inzerčních sekvencí u *B. cenocepacia*. Stáž podpořena Fondem mobility.

### Členství v odborných společnostech:

**od roku 2010:** Česká hematologická společnost ČLS JEP

## Publikované články:

Drevinek P, Vosahlikova S, Dedeckova K, Cinek O, Mahenthiralingam E.: Direct culture-independent Strain typing of *Burkholderia cenocepacia* complex in sputum samples from 2010 Feb 24.

Drevinek P, Baldwin A, Lindenburg L, Joshi LT, Marchbank A, Vosahlikova S, Dowson CG, Mahenthiralingam E.: Oxidative stress of *Burkholderia cenocepacia* induces insertion sequence-mediated genomic rearrangements that interfere with macrorestriction-based genotyping. **J Clin Microbiol.** 2010 Jan;48(1):34-40.

Vosahlikova S, Drevinek P., Cinek O., Pohunek P., Maixnerova M., Urbaskova P., T.J.K. van den Reijden, L. Dijkshoorn, A. Nemeč: 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.

Drevinek, Vosahlikova S., Cinek O., Vavrova V., Bartosova J., Pohunek P., Mahenthiralingam E.: Widespread clone of *Burkholderia cenocepacia* in cystic fibrosis patients in the Czech Republic. **Journal of Medical Microbiology.** (2005), 54, 655- 659.

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).

P. Drevinek, S. Vosahlikova, O. Cinek, V. Vavrova, J. Bartosova, P. Pohunek, E. Mahenthiralingam: Widespread clone of *Burkholderia cenocepacia* in Czech patients with cystic fibrosis. **Journal of Medical Microbiology**, 2005, 54 (7): 655-659.

## Abstrakta a postery:

Vosahlikova S., Omelka M., Drevinek P.: Tracking the transmission of *Burkholderia cenocepacia* within large cystic fibrosis center. Poster. The 23th Annual North American Cystic Fibrosis Conference, Minneapolis, Minnesota, USA; říjen 2009.

Vošahlíková Š., Omelka M., Dřevínek P., Kulich M., Cinek O.: Sledování cest přenosu epidemického kmene *Burkholderia cenocepacia* ST-32 mezi pacienty s cystickou fibrózou. Přednáška, 18. konference mladých mikrobiologů, Tomáškovy dny 2009.

Drevinek P., Vosahlikova S., Cinek O.: Multilocus sequence typing of *Burkholderia cepacia* complex without a need of bacterial culture. Přednáška, International *Burkholderia cepacia* Working Group Meeting, Toronto, Ontario, Canada; 2009.

Vosahlikova S., Drevinek P., Omelka M., Cinek O.: Identification of a novel insertion sequence homologous to IS402 in *B. cenocepacia* epidemic strain ST-32. Poster. The 22th Annual North American Cystic Fibrosis Conference, Orlando, USA; 2008.

Vošahlíková Š., Cinek O., Dřevínek P., Mahenthiralingam E.: Identifikace inzerční sekvence homologní s IS402 u epidemického klonu *Burkholderia cenocepacia* CZ1. Přednáška, 17. konference mladých mikrobiologů, Tomáškovy dny 2008.

Vošahlíková Š., Dřevínek P., Reitzová H., Cinek O., Nyč O., Nemeč A.: Molekulárně genetická diagnostika *Pseudomonas aeruginosa* u pacientů s cystickou fibrózou. Přednáška, 16. konference mladých mikrobiologů, Tomáškovy dny 2007.

Vošahlíková Š., Maixnerová M., Cinek O., Vávrová V., Nyč O., Dijkshoorn L., Nemeč A.: Genotypová diverzita kmenů *Pseudomonas aeruginosa* izolovaných od nemocných s cystickou fibrózou v České republice. Přednáška, 15. konference mladých mikrobiologů, Tomáškovy dny 2006.

Bartosova J., Zemkova D., Brazova J., Bohmova K., Vosahlikova S., NycO., Skalicka,V. Hladikova M., Pohunek P., Vavrova V.: Diagnosis of *Pseudomonas aeruginosa* infection using microbial, molecular-biology a serology techniques. Abstrakt v Journal of Cystic Fibrosis 2006; 5, Suppl. 1: P 72.

Vavrova V., Bartosova J., Fila L., Skalicka V., Brazova J., Bohmova K., Vosahlikova S., Pohunek P., Zemkova D.: Clinical features of *Pseudomonas aeruginosa* (Pa) negative cystic fibrosis (CF) patients with the history of Pa infection. Abstrakt v Journal of Cystic Fibrosis 2006; 5, Suppl. 1, P 149 (S34).

Vosahlikova S., Reitzova H., Cinek O., Drevinek P.: Czech epidemic strain of *Burkholderia cenocepacia* does not belong to ET12 lineage. Přednáška, 14. evropský kongres klinické mikrobiologie a infekčních nemocí (ECCMID). Abstrakt v Clinical Microbiology and Infection, 2004, Suppl 3:O 184.