



UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
3. LÉKAŘSKÁ FAKULTA



---

Laboratoř bakteriální genetiky  
Státní zdravotní ústav Praha

Jan Smíšek

**Prevence infekce *Burkholderia cepacia*  
u nemocných cystickou fibrózou**

*Prevention of Burkholderia cepacia infection  
in cystic fibrosis patients*

*Diplomová práce*

Praha 2009

Autor práce: Jan Smíšek

Studijní program: Všeobecné lékařství

Vedoucí práce: **Doc. RNDr. Alexandr Nemeč, PhD.**

Pracoviště vedoucího práce:

**Laboratoř bakteriální genetiky**

**Státní zdravotní ústav Praha**

Datum a rok obhajoby: 10. září 2009

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem předkládanou práci zpracoval samostatně a použil jen uvedené prameny a literaturu. Svoluji, aby tato diplomová práce byla používána ke studijním účelům.

V Praze dne 1. září 2009

Jan Smíšek

### **Poděkování**

Tato práce vznikala v letech 2004-2009. Za všestrannou pomoc při jejím vypracování po stránce věcné i formální děkuji doc. Alexandru Nemcovi. Můj dík dále patří Dr. Pavlu Dřevínkovi za cenné konzultace a Martině Maixnerové za praktickou pomoc při experimentální části práce.

# Obsah

<b>OBSAH.....</b>	<b>5</b>
<b>1. ÚVOD.....</b>	<b>7</b>
<b>2. CYSTICKÁ FIBRÓZA.....</b>	<b>8</b>
2.1. Etiopatogeneze .....	8
2.2. Klinické projevy .....	9
2.3. Diagnóza.....	10
2.4. Léčebná péče.....	12
2.5. Infekce .....	13
2.5.1. <i>Staphylococcus aureus</i> .....	14
2.5.2. <i>Haemophilus influenzae</i> .....	14
2.5.3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	15
2.5.4. <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> .....	16
2.5.5. <i>Alcaligenes xylosoxidans</i> .....	16
2.5.6. Rod <i>Acinetobacter</i> .....	16
2.5.7. Rod <i>Ralstonia</i> .....	17
2.5.8. Rod <i>Pandoraea</i> .....	17
2.5.9. Rod <i>Burkholderia</i> .....	17
2.5.10. Atypická mykobaktéria .....	17
2.5.11. Rod <i>Candida</i> .....	17
2.5.12. Rod <i>Aspergillus</i> .....	18
2.5.13. Respirační syncytiální virus (RSV).....	18
<b>3. BURKHOLDERIA CEPACIA.....</b>	<b>19</b>
3.1. Taxonomie .....	20
3.2. Patogenita bakterií komplexu <i>B. cepacia</i> .....	21
3.3. Infekce.....	23
3.4. Infekce u pacientů s CF a cepacia syndrom .....	23
3.5. Laboratorní průkaz bakterií komplexu <i>B. cepacia</i> .....	24
3.5.1. Kultivační metody .....	24
3.5.2. Fenotypové identifikační metody.....	25
3.5.3. Molekulově-genetické identifikační metody.....	26
3.5.4. Molekulově-genetické typizační metody.....	27
3.6. Epidemické klony komplexu <i>B. cepacia</i> .....	28
3.6.1. CZ1 klon .....	29
<b>4. PREVENCE INFEKCE BAKTERIEMI KOMPLEXU B. CEPACIA.....</b>	<b>30</b>
4.1. Historie preventivních opatření .....	30
4.2. Současná preventivní opatření .....	30
4.3. Management pacientů s infekcí Bcc .....	32
4.4. Antimikrobní léčba .....	32
4.4.1. Antimikrobní látky účinné proti Bcc.....	33
4.4.2. Predikce účinku antimikrobních látek .....	35
4.5. Dezinfekce.....	36

4.5.1. Dezinfekční látky účinné proti komplexu B. cepacia.....	37
4.5.2. Predikce účinků dezinfekčních látek .....	38
<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST: CITLIVOST EPIDEMICKÉHO KLONU B. CENOCEPACIA CZ1 K ANTIMIKROBNÍM A DEZINFEKČNÍM LÁTKÁM.....</b>	<b>40</b>
<i>Úvod a cíl práce .....</i>	<i>40</i>
<i>Metodika .....</i>	<i>40</i>
<i>Vyšetřované kmeny .....</i>	<i>40</i>
<i>Vyšetření citlivosti k antimikrobním látkám.....</i>	<i>41</i>
<i>Vyšetření citlivosti k dezinfekčním látkám .....</i>	<i>41</i>
<i>Výsledky a diskuze .....</i>	<i>42</i>
<i>Citlivost k antimikrobním látkám .....</i>	<i>42</i>
<i>Citlivost k dezinfekčním látkám .....</i>	<i>45</i>
<b>ZÁVĚR.....</b>	<b>47</b>
<b>SOUHRN .....</b>	<b>48</b>
<b>SUMMARY.....</b>	<b>49</b>
<b>POUŽITÁ LITERATURA .....</b>	<b>50</b>
<b>SEZNAM OBRÁZKŮ A TABULEK.....</b>	<b>53</b>

## 1. Úvod

Téma diplomové práce jsem si vybral na základě svého dlouhodobého zájmu o problematiku podmíněně patogenních gramnegativních bakterií a jejich rezistence k antimikrobním látkám. Tyto bakterie jsou častými původci nozokomiálních infekcí nebo závažných infekcí u predisponovaných pacientů.

Mezi významné gramnegativní patogeny patří bezesporu bakterie komplexu *Burkholderia cepacia*. Jejich největší význam spočívá ve schopnosti kolonizovat dýchací cesty a způsobit závažné infekce u nemocných cystickou fibrózou.

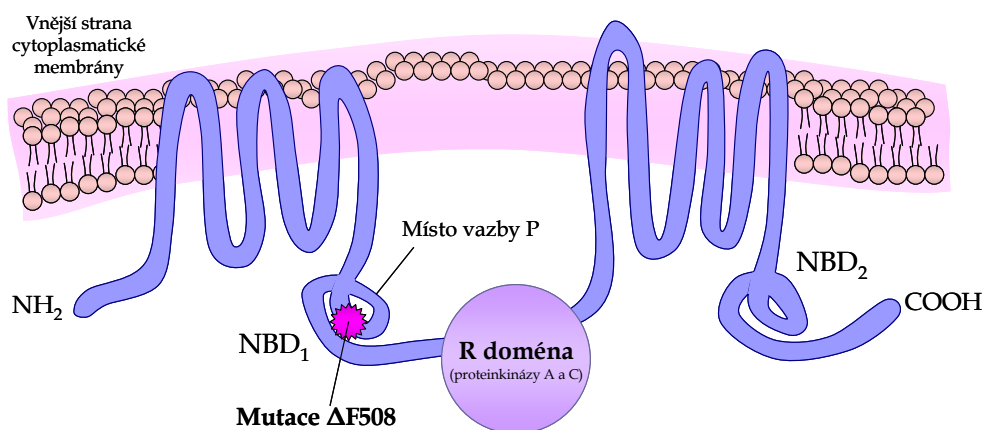
V ČR představuje vysoká prevalence komplexu *Burkholderia cepacia* v populaci pacientů s cystickou fibrózou závažný epidemiologický problém na jehož řešení se ve specializovaných centrech podílejí multidisciplinární týmy složené z klinických lékařů, mikrobiologů, epidemiologů a hygieniků. Studium problematiky infekcí *Burkholderia cepacia* mi umožnilo poznat práci těchto týmů i její klinické aplikace.

## 2. Cystická fibróza

Cystická fibróza (CF) neboli mukoviscidóza je jedním z nejčastějších recesivních autozomálních lidských genetických onemocnění. Nemoc je rozšířena hlavně v Evropě a v Severní Americe mezi europoidní populací. Incidence choroby se v rámci jednotlivých oblastí liší, v ČR je postiženo zhruba jedno z 2500 – 3000 živě narozených dětí (Vavřinec et al. 2002).

### 2.1. Etiopatogeneze

Příčinou choroby je mutace genu pro CFTR (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*), což vede ke změně této molekuly, která plní funkci chloridové pumpy závislé na cyklickém adenosinmonofosfátu (cAMP). Tato pumpa se nachází v apikální membráně buněk dýchacích cest a dalších buněk epitelální tkáně kde transportuje chloridové ionty vně buněk čímž se podílí na regulaci osmolality extracelulárních sekretů (Boucher et al. 2005).

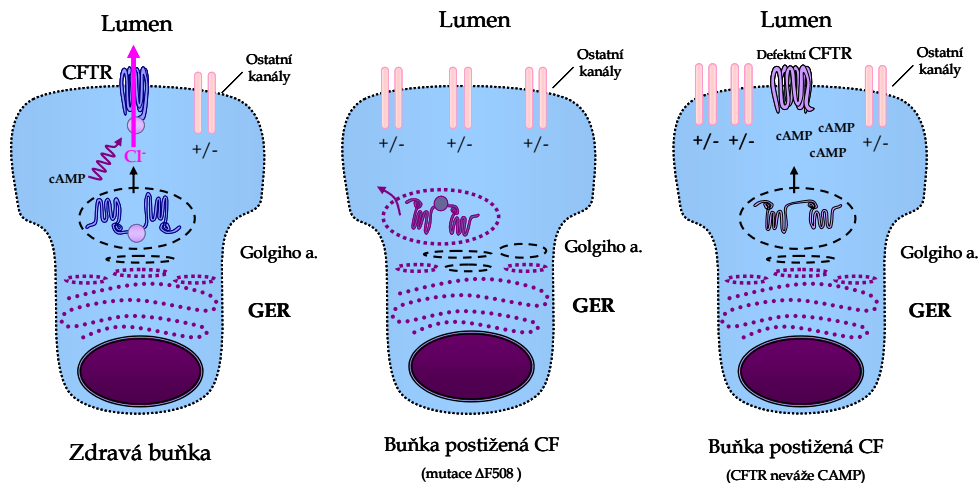


**Obrázek 1.** – schéma CFTR a umístění mutace  $\Delta$  F508 na CFTR – dle Boucher *et al.* (2005)

Gen pro CFTR se u člověka nachází na 7. chromozomu a je popsáno již více než 400 různých mutací tohoto genu. Nejčastější je delece kodonu pro aminokyselinu fenylalanin na 508. místě molekuly ( $\Delta$  F508), která se vyskytuje v 70 – 90 % případů CF v severní Evropě a Severní Americe a u 50 % nemocných ve středomořské oblasti. Další mutace genu nejsou tak časté a jsou zeměpisně a etnicky omezené. Mutace genu pro CFTR jsou v europoidní populaci velmi



rozšířené - každý 23. až 32. člověk je nositelem jedné poškozené alely (Boucher et al. 2005).



**Obrázek 2.** – Rozdíly ve tvorbě a funkci CFTR u zdravé buňky a buněk postižených CF – dle (Boucher et al. 2005)

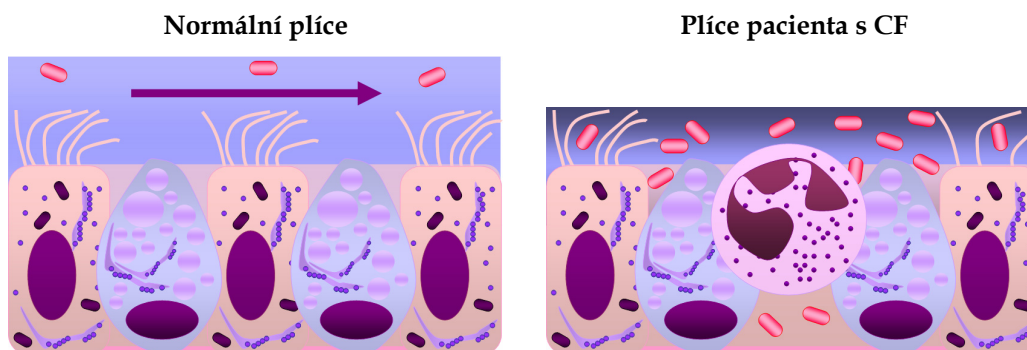
Mutace může pumpu změnit tak, že ta vůbec neopustí endoplazmatické retikulum a do apikální membrány se nedostane (případ produktu genu s mutací  $\Delta F508$ ), anebo nemůže vázat cAMP. To vede ke **narušení přenosu chloridových iontů**, snížení jejich extracelulární hladiny a tím kompenzačnímu zvýšení vstřebávání natria a vody z extracelulárního sekretu do buňky (Boucher et al. 2005).

## 2.2. *Klinické projevy*

**Snížení koncentrace chloridových iontů** v sekretu a následné vstřebávání iontů natria a vody vede k **zahuštění extracelulárního sekretu**. Ten je zvýšeně viskózní a hromadí se v některých orgánech, čímž vyvolává postižení vedlejších dutin nosních, dolních cest dýchacích a plic, pankreatu (insuficience zevní sekrece), tenkého i tlustého střeva, jater a žlučníku a reprodukčního ústrojí (Vavřínek et al. 2002).

Následky hromadění vazkého hlenu jsou nejvýznamnější v plicích. Narušení mukociliární clearance, která u zdravých lidí hraje hlavní roli v odstraňování infekčních částic z dolních cest dýchacích vede k bakteriální

kolonizaci a vzniku chronického zánětu. Ten dále vede ke vzniku bronchiektázií, hyperinflaci a snížení elasticity. Tyto změny způsobují kašel s expektorací hnisavého sputa a dýchací obtíže (Vavřinec et al. 2002).



**Obrázek 3.** – Mukociliární clearance – nahromadění viskózního hlenu v dýchacích cestách pacienta s CF vede ke bakteriální kolonizaci a zánětu – volně dle Boucher *et al.* (2005)

Chronický zánět způsobený infekcí rovněž způsobuje masivní příliv polymorfonukleárů (PMN) a aktivaci makrofágů, důsledkem čehož je hromadění proteáz (elastáz a kolagenáz), eosinofilů (uvolňují kationický protein), cytokinů, volných kyslíkových radikálů, DNA uvolněné z rozpadlých PMN a filamentózního aktinu (Gibson et al. 2003). To nadále zhoršuje změny způsobené zánětem a vede k **těžkým poškozením plicní tkáně** (Boucher et al. 2005).

Projevy CF v jednotlivých orgánových systémech shrnuje Tabulka 1. Vzhledem k tomu, že projevy CF a jejich závažnost se u jednotlivých nemocných liší, nemusí být příznaky dlouho rozpoznány nebo jsou zaměněny s příznaky jiného onemocnění jako je astma bronchiale nebo intolerance laktózy. Předpokládá se, že s nediagnostikovanou CF žije až 1/3 nemocných (Dřevínek 2005).

### 2.3. *Diagnóza*

Diagnóza CF je u velké části nemocných stanovena již v raném věku. Na počátku diagnózy stojí obvykle **klinické podezření**, které se opírá o přítomnost některého z charakteristických klinických respiračních a gastrointestinálních příznaků nebo neprospívání (Vavřinec et al. 2002).

**Tabulka 1.** - Nejčastější příznaky - dle (Boucher et al. 2005)

- **Postižení respiračního traktu**
  - **Dýchací cesty**
    - Chronický kašel
    - Hemoptyza
    - Bronchiektasie
    - Nosní polypy
    - Pansinusitis
  - **Plíce**
    - Recidivující pneumonie
    - Tachypnoe
    - Hvízdání
    - Atelektáza
    - Chronické infekce
  - **Projevy mimo dýchací trakt**
    - Soudkovitý hrudník
    - Paličkovité prsty
- **Postižení gastrointestinálního traktu**
  - **Pankreas**
    - Chronická pankreatitida
    - Insuficience zevní sekrece
    - Diabetes mellitus (CF related DM)
    - Porucha stavu výživy
  - **Játra a žlučové cesty**
    - Novorozenecká cholestáza
    - Steatóza jater
    - Fokální nebo multilobulární jaterní cirhóza
    - Abnormality žlučnicku
    - Cholelitiáza
  - **Jícen a žaludek**
    - Refluxní choroba jícnu,
    - ezofagitis
    - Žaludeční a duodenální vřed
    - Gastritis
  - **Střevo**
    - Crohnova choroba
    - Celiakie
    - Mekoniový ileus
    - Syndrom obstrukce distálního střeva (DIOS)
    - Invaginace a volvulus
    - Apendicitis, absces nebo perforace appendixu
    - Fibrotizující kolonopatie
    - Prolaps rekta
    - Karcinom
- **Projevy postižení ostatních orgánových systémů**
  - **Kardiovaskulární systém**
    - Kardiomyopatie
    - Vaskulitidy
    - Amyloidóza
  - **Krev a homeostáza**
    - Deficit vitamínu A
    - Anémie a edém u kojenců
    - Hyponatrémie
    - Hypochlorémie
    - Metabolická alkalóza
    - Výrazně slaný pot
  - **Rozmnožovací systém**
    - Snížená fertilita u žen
    - U mužů v 98% sterilita
  - **Pohybový aparát**
    - Arthritidy

Pro léčbu je včasné rozpoznání nemoci velmi důležité. U naprosté většiny nemocných je diagnóza CF stanovena **potním testem**, kterým je zjištěn vysoký obsah NaCl v potu a je ho možné provádět i ambulantně. Pot pacienta se odebírá po stimulaci tzv. **pilokarpinovou iontoforézou**. Za normální koncentraci chloridu v potu považujeme u dětí hodnoty NaCl do 40 mmol/l, u dospělých do 60 mmol/l (Vavřínek et al. 2002). Na CF je potřeba myslet i při hraničním nálezu a pozitivních klinických příznacích. K vyloučení laboratorní chyby, je nutné test opakovat, přičemž každý pozitivní test je nutno ověřit **genetickým vyšetřením mutací genu pro CF** (Dřevínek 2005).

#### **2.4. Léčebná péče**

Vzhledem k tomu, že chronická infekce dýchacích cest zhoršuje průběh CF, je třeba před ní nemocné chránit. Je nezbytné, aby nemocní byli informováni o tom, kterými mikroby jsou infikováni a dodržovali všechna doporučená **hygienická opatření**. V zdravotnických zařízeních je důležité dodržovat kromě obvyklých preventivně hygienických opatření i **režim přísné sepace nemocných s CF** (Dřevínek 2005).

Protizánětlivá léčba se provádí kortikoidy i nesteroidními antiflogistiky. **Léčba kortikoidy** zlepšuje funkci plic, má však radu vedlejších příznaků (katarakta, poruchy růstu, diabetes, osteoporóza). Nesteroidní léčba není tak výrazně zatížena nežádoucími účinky a působí selektivně na činnost neutrofilů (Gibson et a. 2003).

Další významnou částí péče o pacienty s CF je **inhalační léčba**, jejímž cílem je lokální farmakoterapie sliznice dýchacích cest pomocí inhalátoru. Inhalátory vytváří jemnou suspenzi farmaka, které je pak deponováno v různých částech dolních dýchacích cest a plic. Prostřednictvím inhalátoru se podávají antibiotika, mukolytika, bronchodilatancia i protizánětlivé léky (Gibson et a. 2003). Pro inhalační léčbu se v současnosti používají **tryskové inhalátory typu PARI**, které rozprašují aerosol pomocí kompresoru. Inhalátory je nutné udržovat v dostatečné čistotě, je vhodné je denně mýt, dezinfikovat, důkladně po dezinfekci propláchnout a vysušit. Každý pacient má vlastní inhalátor (CF Klub).

Mezi další léčebné metody patří léčení komplikací postihující dýchací ústrojí, dlouhodobá domácí kyslíková léčba a transplantace plic. Velké naděje pro léčbu CF se vkládají do metod genové terapie (Vavřinec et al. 2002).

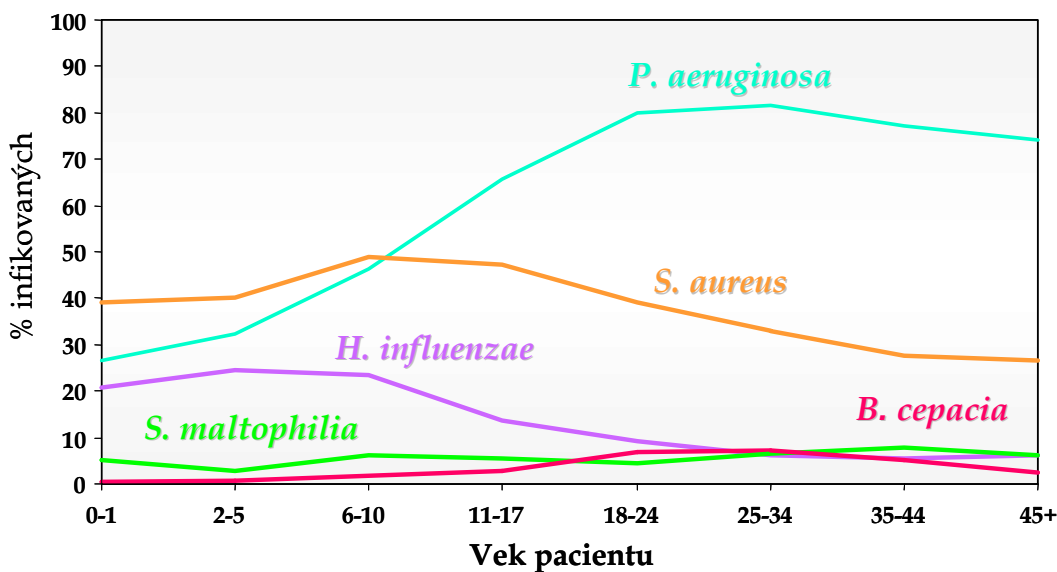
## 2.5. Infekce

Specifickou kapitolu současné léčby nemocných s CF je léčba recidivujících a chronických bakteriálních infekcí dýchacích cest, které jsou hlavní příčinou vysoké nemocnosti a úmrtnosti (Dřevínek 2005).

Klinické projevy těchto infekcí zahrnují zejména **chronickou bronchitidu a recidivující pneumonie**. Chronická bronchitida vede u CF pacientů k chronickému kašli a vzniku bronchiektázií (Gibson et al. 2003). Recidivující pneumonie jsou doprovázeny vysokými teplotami, poškozují plicní parenchym a postupně vedou k respirační insuficienci nebo přecházejí v sepsi, která může končit smrtí pacienta (Caparro et al. 2001; Vavřinec et al. 2002).

Infekce se léčí trvale ode dne stanovení diagnózy. Léčba je zahájena vždy **při záchyt patogenního mikroba** v sekretu dýchacích cest i při objevení i nejméně závažných klinických příznaků. Antibiotika se ve vysokých dávkách podávají minimálně po dobu 10 – 14 dnů (Fila 2007).

Existuje poměrně **úzké spektrum patogenů**, které mohou uplatnit jako etiologické agens závažných infekcí pacientů s CF (Gibson et al. 2003). V útlém věku jsou pacienti infikováni především *Staphylococcus aureus* a *Haemophilus influenzae*, v pozdějším věku pak významně stoupá procento pacientů s infekcí způsobenou *Pseudomonas aeruginosa* (viz obrázek 4.). Spektrum patogenů asociovaných s CF doplňují bakterie *Stenotrophomonas maltophilia*, *Achromobacter xylosoxidans*, *Acinetobacter spp.*, *Ralstonia spp.*, *Pandoraea spp.*, bakterie komplexu *Burkholderia cepacia*, atypická mykobaktéria, mykotické organismy *Candida spp.* a *Aspergillus spp.* případně viry jako např. Respirační syncytiální virus (Dřevínek 2005; O'Malley 2009; Razvi et al. 2009).



**Obrázek 4.** – Závislost kolonizace jednotlivými druhy na věku pacienta – procentuální zastoupení vybraných patogenů u všech CF pacientů v USA v roce 2002 – dle Gibson et al. 2003

*P. aeruginosa* 57,8%      *S. aureus* 49,7%      *H. influenzae* 16,3 %  
*S. maltophilia* 9,4%      *B. cepacia* 3,1%

### 2.5.1. *Staphylococcus aureus*

Je gram pozitivní kok běžný v prostředí, který se často kolonizuje kůži a nosní sliznici člověka. U lidí způsobuje řadu závažných infekcí. Pacienty s CF kolonizuje především v dětském věku, později jeho procentuální zastoupení klesá. Postupným nárůstem **rezistence vůči antibiotikům**, spolu s výraznou odolností vůči vnějším vlivům (vysychání, vysoká teplota, dezinfekční prostředky) se staly kmeny *S. aureus* velkým problémem v péči o nemocné s CF (Hutchison et al. 1999). Jako významný CF patogen se uplatňují i kmeny rezistentní k meticilinu (MRSA – *methicillin resistant S. aureus*), které se mohou mezi jednotlivými pacienty přenášet (O'Malley 2009).

### 2.5.2. *Haemophilus influenzae*

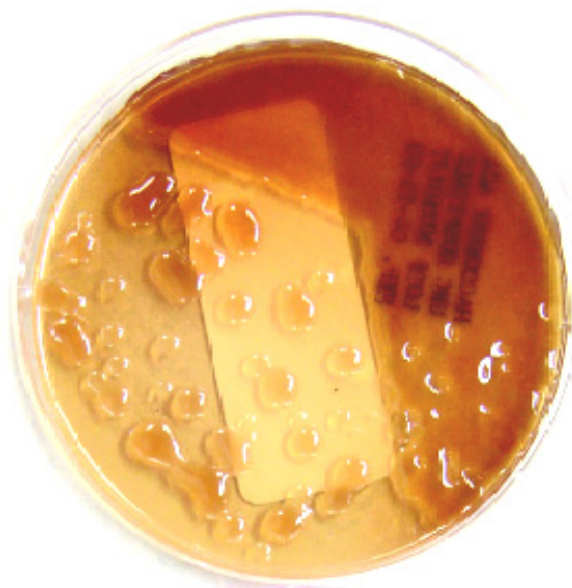
Je gram negativní tyčinka, která se uplatňuje jako významný patogen dýchacích cest v komunitě. Je známo šest sérologických typů *H. influenzae* odlišovaných podle polysacharidového pouzdrného antigenu, z nichž klinicky nejvýznamnější je typ b. *H. influenzae* se přenáší kapénkami a zdrojem je

výhradně člověk. Je častější u CF pacientů v dětském věku (Hutchison et al. 1999). Významná je jeho rezistence k  $\beta$ -laktamovým antibiotikům (Gibson et al. 2003).

### 2.5.3. *Pseudomonas aeruginosa*

Je nefermentující gramnegativní tyčinka, která se běžně vyskytuje v zevním prostředí, zejména ve vodě a půdě kontaminované výkaly lidí a zvířat. Řadí se mezi **významné původce nozokomiálních nálezů**, řada izolátů je multirezistentních.

Je významným patogenem u neutropenických pacientů, pacientů na jednotkách intenzivní péče, kde způsobuje nozokomiální infekce. U pacientů s CF způsobuje těžkou chronickou plicní infekci a často kolonizuje i jejich vedlejší nosní dutiny. Počet infikovaných pacientů s CF roste s věkem (Gibson et al. 2003). V dospělém věku je kolonizováno až 80 % pacientů. Chronická infekce způsobená *P. aeruginosa* je definovaná jako **trvalá perzistence bakterie** po dobu nejméně šest měsíců nebo jako průkazný vzestup protilátek (Hutchison et al. 1999). Charakteristickým příznakem chronické infekce *P. aeruginosa* je tvorba mukoidního alginátu (obr. 5) a mikrokolonií, které jsou špatně prostupné pro antibiotika.



Obrázek 5. – Mukoidní kolonie *Pseudomonas aeruginosa*  
Publikováno s laskavým svolením P. Dřevínka (FN Motol)

Mukoidní fenotyp *P. aeruginosa* je spojen s horším průběhem infekce (Hutchison et al. 1999). Proto je důležitý včasný záchyt počáteční kolonizace *P. aeruginosa* tj. v době, kdy bakterie ještě nebývá přítomna v mukoidní formě. Primární záchyt nutně následuje razantní antibiotická léčba, kterou lze chronickou kolonizaci oddálit o několik měsíců až let (O'Malley 2009).

#### **2.5.4. *Stenotrophomonas maltophilia***

Je nefermentující gramnegativní tyčinka, běžně rozšířená v přírodě, přirozeně rezistentní k některým  $\beta$ -laktamům a aminoglykozidům. Patří mezi významné původce nozokomiálních nákaz. Výskyt u CF pacientů není závislý na věku a pohybuje se obvykle pod hranicí 10% (Davies & Rubin 2007).

#### **2.5.5. *Alcaligenes xylosoxidans***

Je gramnegativní aerobní pohyblivá bakterie tvaru malých tyček či koků. Vyskytuje se často v půdě, vodě a stolici. Je podmíněným patogenem a působí často nozokomiální infekce, např. močových cest. Je přirozeně rezistentní proti řadě antibiotik včetně aminoglykozidů. U pacientů s CF může způsobit pneumonii. Vzhledem k tomu, že se incidence nákaz v jednotlivých CF centrech liší, usuzuje se, že pravděpodobně dochází k přenosu infekce mezi pacienty (O'Malley 2009).

#### **2.5.6. Rod *Acinetobacter***

Jsou gramnegativní striktně aerobní krátké tyčinky až koky uspořádané obvykle ve dvojicích. Jsou běžně rozšířeny v přírodě a mohou se vyskytovat na kůži zdravých lidí (Coenye et al. 2002). Jsou významnými původci nozokomiálních nákaz zejména u pacientů v intenzivní péči. U pacientů s CF je nejčastěji postižen dolní respirační trakt. Klinické izoláty acinetobakterů náležející k lékařsky nejvýznamnějšímu druhu *Acinetobacter baumannii* jsou často multirezistentní. Pokračující vývoj rezistence *A. baumannii* vede k obavám z úplného selhání antibiotické léčby vyvolaných infekcí (Davies & Rubin 2007).



### 2.5.7. **Rod *Ralstonia***

Jsou nefermentující gramnegativní tyčinky, běžně rozšířené v prostředí. Vzácně způsobují nozokomiální nákazy a některé druhy (např. *Ralstonia insidiosa* a *Ralstonia respiraculi*) se vzácně izolují ze sputa nemocných s CF (Davies & Rubin 2007; Coenye et al. 2002).

### 2.5.8. **Rod *Pandoraea***

Jsou nefermentující gramnegativní tyčinky, blízce příbuzné burkholderiím. Některé druhy (např. *Pandoraea apista*, *Pandoraea pulmonicola*, *Pandoraea pnomenus* a *Pandoraea sputorum*) mohou způsobovat nozokomiální infekce a izolují se i ze sputa pacientů s CF. Při rutinní fenotypové identifikaci je lze snadno zaměnit s druhem *B. cepacia* (Davies & Rubin 2007; Coenye et al. 2002).

### 2.5.9. **Rod *Burkholderia***

Jako patogeny u nemocných CF se významně uplatňují **bakterie komplexu *Burkholderia cepacia***, jimž se podrobně věnuje kapitola 3. Vzácně se mohou u pacientů s CF uplatnit i druhy rodu *Burkholderia* nezařazené do komplexu, např. *B. gladioli* nebo *B. fungorum* (Coenye et al. 2002).

### 2.5.10. **Atypická mykobaktéria**

Jsou acidorezistentní tyčinky s dlouhou generační dobou, způsobující u člověka specifický granulomatózní zánět. Jako patogeny u nemocných s CF se mohou uplatňovat zejména *Mycobacterium avium* a *Mycobacterium abscessus* (O'Malley 2009). Významnými rizikovými faktory infekce jsou pravděpodobně systémová steroidní léčba a současně probíhající aspergilová infekce (Mussaffi et al. 2005).

### 2.5.11. **Rod *Candida***

Jsou dimorfní kvasinky, které se často vyskytují jako součást přirozené střevní a ústní mikroflóry. Typickou vlastností kandid je střídání fenotypů včetně změny vzhledu buněk. Při infekci u pacientů s CF se do plic dostává obvyklá jednobuněčná kvasinková forma. Ta se vlivem prostředí může změnit v

invazivní mnohobuněčnou vláknitou formu, což obvykle vede ke zhoršení klinického stavu pacienta (O'Malley 2009).

#### **2.5.12. Rod *Aspergillus***

Jsou vřecovýtrusné vláknité houby, široce rozšířené v prostředí. Některé druhy (např. *Aspergillus fumigatus*) způsobují infekce, tzv. aspergilózu, a alergické reakce, které zasahují především nosní dutiny a dolní dýchací cesty. U pacientů s CF může dojít k alergické bronchopulmonární aspergilóze nebo ke kolonizaci dolních dýchacích cest, která může přerůst v diseminovanou infekci s infaustní prognózou (O'Malley 2009).

#### **2.5.13. Respirační syncytiální virus (RSV)**

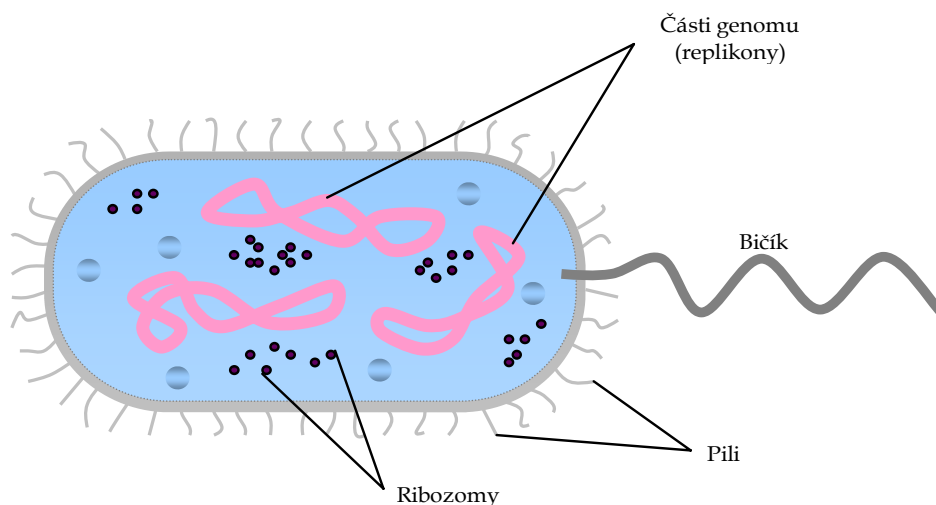
Je RNA virus způsobující u zdravé zejména dětské populace běžné respiračně přenosné onemocnění, bronchiolitidu. U pacientů s CF však infekce RSV probíhá pod vážnějším klinickým obrazem vyžadujícím hospitalizaci a umělou plicní ventilaci (O'Malley 2009).

### 3. *Burkholderia cepacia*

Bakterie rodu *Burkholderia* jsou gramnegativní tyčinky, běžně rozšířené v přírodě. Jejich přirozeným rezervoárem je stojatá i tekoucí voda a půda, v níž většinou osídlují kořeny rostlin. Poprvé se tato bakterie zapsala do odborné literatury jakožto rostlinný škůdce. V roce 1950 americký botanik **Walter H. Burkholder** popsal hnilobu cibule a bakterii, jež byla její příčinou, zařadil mezi pseudomonády a podle latinského názvu cibule (*Allium cepa*) pojmenoval *Pseudomonas cepacia*. Po reklasifikaci pseudomonád na základě výsledků analýzy genů pro 16S rRNA, DNA-DNA hybridizace, analýzy mastných kyselin a fenotypových testů byla *P. cepacia* přeřazena do rodu *Burkholderia* (Dřevínek 2005).

Později byl tento druh zachycen jako **původce závažných nozokomiálních infekcí** a zařadil se mezi významné podmíněné patogeny. *B. cepacia* byla opakovaně diagnostikována u imunokompromitovaných pacientů (např. u pacientů s chronickou granulomatózní nemocí), avšak nejvíce se začala objevovat u pacientů s CF (Mahenthalingam et al. 2008).

*Burkholderia cepacia* patří spolu s dalšími blízkými příbuznými bakteriemi do komplexu *Burkholderia cepacia* (*Bcc*). **Bakterie Bcc** jsou kataláza-pozitivní, nefermentující, gramnegativní, striktně aerobní a pohyblivé tyčinky. Jsou pozoruhodné svým **unikátním genomem**, jehož velikost se pohybuje mezi 6 - 9 Mb a jenž je rozdělen do 2 - 4 replikonů (obr. 5) (Mahenthalingam et al. 2002).



Obrázek 5. - Schématické zobrazení buňky *Burkholderia cepacia*

### 3.1. Taxonomie

V klinické praxi užívané označení *Burkholderia cepacia* je z taxonomického hlediska zjednodušením. Ve skutečnosti jde o *Bcc* (komplex *B. cepacia*) který v současnosti zahrnuje 17 druhů s taxonomicky validními jmény (Tabulka 2). Tyto druhy se dříve řadily do tzv. genomovarů označených římskými číslicemi. Tak např. klinicky nejvýznamnější druh *Burkholderia cenocepacia* odpovídá genomovaru III (Vanlaere et al. 2008). I když infekci mohou způsobit všechny druhy *Bcc*, od pacientů s CF se nejčastěji izolují *B. cenocepacia*, *B. cepacia*, *B. dolosa*, *B. multivorans* a *B. stabilis*. Některé z těchto druhů (zvláště *B. cenocepacia*) jsou spojeny se závažnějším průběhem infekce a přenosem mezi pacienty (McDowell et al. 2004).

K spolehlivé identifikaci jednotlivých druhů *Bcc* je nutno použít **molekulově genetické metody**. Základní metodou je PCR se specifickými primery pro gen *recA* (Vanlaere et al. 2008), která odlišuje prvních sedm druhů (Tabulka 2), což dostačuje pro klinickou praxi. Naprostá většina izolátů z pacientů s CF totiž patří k *B. cenocepacia* (67,5%), *B. multivorans* (17,3%) nebo *B. stabilis* (2,4%) (Mahenthiralingam et al. 2002). Druhová identifikace je významná pro prognózu infekce, neboť největší komplikace (signifikantní zhoršení plicních funkcí, cepacia syndrom, riziko přenosu infekce na další pacienty) se vyskytují u infekcí způsobených *B. cenocepacia*. Nicméně **diagnóza jakéhokoli druhu *Bcc*** je pro další průběh základního onemocnění nepříznivá (Mahenthiralingam et al. 2008; Dřevínek 2005).

Tabulka 2. – Nomenklatura komplexu <i>B. cepacia</i> (Vanlaere et al. 2008)	
Označení	Rodový a druhový název
Genomovar I.	<i>Burkholderia cepacia</i>
Genomovar II.	<i>Burkholderia multivorans</i>
Genomovar III.	<i>Burkholderia cenocepacia</i>
Genomovar IV.	<i>Burkholderia stabilis</i>
Genomovar V.	<i>Burkholderia vietnamiensis</i>
Genomovar VI.	<i>Burkholderia dolosa</i>
Genomovar VII.	<i>Burkholderia ambifaria</i>
Genomovar VIII.	<i>Burkholderia anthina</i>
Genomovar IX.	<i>Burkholderia pyrrocinia</i>
Genomovar X.	<i>Burkholderia ubonensis</i>
	<i>Burkholderia latens</i>
	<i>Burkholderia diffusa</i>
	<i>Burkholderia arboris</i>
	<i>Burkholderia seminalis</i>
	<i>Burkholderia metallica</i>
Taxon K	<i>Burkholderia contaminans</i>
Taxon K	<i>Burkholderia lata</i>

### 3.2. Patogenita bakterií komplexu *B. cepacia*

Genom bakterií *Bcc* obsahuje velké množství inzerčních sekvencí, které zodpovídají za vysokou četnost intragenomových přestaveb a dodávají tak genomu mimořádnou plasticitu. Tyto mobilní elementy jsou také součástí **genomových ostrovů patogenity**, jež zřejmě hrají významnou roli v bakteriální virulenci (Mahenthalingam et al. 2008). Tyto ostrovy jsou velké několik desítek kilobází a obsahují obvykle desítky genů, mezi nimiž například geny pro systém *quorum sensing* a gen *esmR*. *Quorum sensing* umožňuje bakteriím pomocí signálních molekul (N-acylhomoserinových laktonů) vnímat okolní hustotu vlastní populace a při překročení kritické biomasy řídí expresi dosud nevyužitých genů. **Gen *esmR***, jenž pravděpodobně kóduje negativní regulátor

transkripce, byl již delší dobu znám jako součást úseku DNA dlouhého 1,4 kb a označovaného BCESM (*B. cepacia* epidemic strain marker). Tento úsek se vyskytuje u epidemických kmenů a je také genetickým markerem přenosných kmenů (Mahenthiralingam et al. 2002).

K faktorům patogenity patří vedle *quorum sensing* také **extracelulární toxické produkty** - lipázy, proteázy, hemolysiny, katalázy a siderofory (transportní molekuly vázající ionty železa). V patogenitě se dále uplatňuje lipopolysacharidový endotoxin a strukturní komponenty zprostředkovávající primární adhezi bakterií k epitelu dýchacích cest (Gibson et al. 2003). Faktory patogenity uvádí Tabulka 3.

Bakterie se mohou bránit před antiinfekční imunitou či před expozicí antibiotiky vstupem do buněk makrofágů a epitelů nebo tvorbou biofilmu (Dřevínek 2005). Bakteriální společenství, které na povrchu respiračního epitelu vytváří **exopolysacharidem stmelenou biofilmovou vrstvu**, poskytuje jednotlivým buňkám vyšší ochranu před stresovými podněty z prostředí a je významným faktorem snižujícím klinickou odpověď na léčbu antimikrobními látkami (Caraher et al. 2007).

Tabulka 3. - Pravděpodobné faktory patogenity komplexu <i>B. cepacia</i>	
Faktor patogenity	Funkce
Pili (povrchové výběžky)	Adheze k epitelům a mucinu (předpokládá se, že <i>Burkholderia</i> má afinitu k mucinu). Ovlivňujícím faktorem je i předchozí infekce <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .
Cable pili	Vysoce přenosné, adheze.
Proteáza	Intracelulární působení proteázy vede k poškození tkání, u člověka není jejich role přesně určena.
Hemolyzin	Indukuje fagocytózu a degranulaci fagocytujících buněk.
Fosfolipáza C	Štěpí důležité fosfátové skupiny u hostitele.
Siderofory	Získávání železa
Lipopolysacharidy	Cytotoxické působení a indukce produkce cytokinů
Exopolysacharidy	Jejich působení je charakterizováno <i>in vitro</i> , ale jejich působení <i>in vivo</i> není vysvětleno
Melanin	Adsorpce volných radikálů, produkovaných fagocyty po fagocytóze.

### 3.3. *Infekce*

Bakterie *Bcc* jsou podmíněné patogeny, tj. vyvolávají onemocnění většinou jen u hostitele s **poruchou obranyschopnosti**. Ta je přirozeně nízká u novorozenců, starých lidí a gravidních žen. Druhotné snížení obranyschopnosti vzniká následkem onemocnění primárně postihujícího imunitní systém nebo sekundárním narušením imunitních mechanismy způsobených chorobami jiných orgánů. Z těchto druhotných snížení obranyschopnosti je z hlediska bakteriálních infekcí nejvýznamnější **neutropénie**, tj. pokles polymorfonukleárních leukocytů pod 500 buněk/ml, vedoucí k závažnému riziku infekcí. Neutropénie vzniká u pacientů s akutní leukémií, v indukční fázi chemoterapie, po ozařování a u pacientů v časně fázi po transplantaci, zejména kostní dřeně (Dřevínek 2005).

Bakterie *Bcc* ohrožují především pacienty s **chronickou granulomatózní chorobou** (CGD), tj. vrozeným chronickým postižením fagocytární funkce polymorfonukleárních leukocytů, a pacienty s CF. S ohledem na vyšší zastoupení diagnózy CF než CGD v obecné populaci představuje cystická fibróza nozologickou jednotku, jež je nejčastěji spojena s infekcí způsobenou *Bcc* (Mahenthiralingam et al. 2002).

Seznam možného výskytu bakterií *Bcc* nutno doplnit o anesteziologicko-resuscitační oddělení či jednotky intenzivní péče, kde se tyto bakterie mohou uplatnit jako původci **nozokomiálních infekcí** (Mahenthiralingam et al. 2002).

### 3.4. *Infekce u pacientů s CF a cepacia syndrom*

Klinický obraz infekce u pacientů s CF je variabilní. Postiženy jsou hlavně plíce ve kterých dochází k velmi těžkým pneumoniím, které jsou jen obtížně ovlivnitelné antibiotiky. Pablány, které bakterie v alveolech tvoří značně ztěžují přístup antibiotik k bakteriím. Často je zmiňován smrtící **cepacia syndrom**, který je po různě dlouhém trvání infekce charakterizován náhlým zhoršením klinického stavu doprovázeným nekrotizující pneumonií a sepsí, která může končit i smrtí pacienta. Infekce však může vést jen k pozvolnému **zhoršování klinického stavu**, či dokonce nemusí pacienta nijak poškozovat. Dosud nejsou známy všechny faktory, které rozhodují o tom, jakým způsobem bude infekce u konkrétního pacienta s CF probíhat, a nelze tak ani předvídat, zda se infekce náhle neprojeví i u dosud asymptomatických pacientů (Dřevínek 2005).

Přestože infekce *Bcc* nevede nevyhnutelně ke zhoršování plicní funkce, je obecně spojena s průkazným **snížením dlouhodobého výhledu pacienta na přežití** a je pravděpodobné, že na její průběh bude mít zásadní vliv jak klinický stav pacienta, tak specifické vlastnosti konkrétního kmene *Bcc*, jímž je pacient infikován. (Mahenthiralingam et al. 2002).

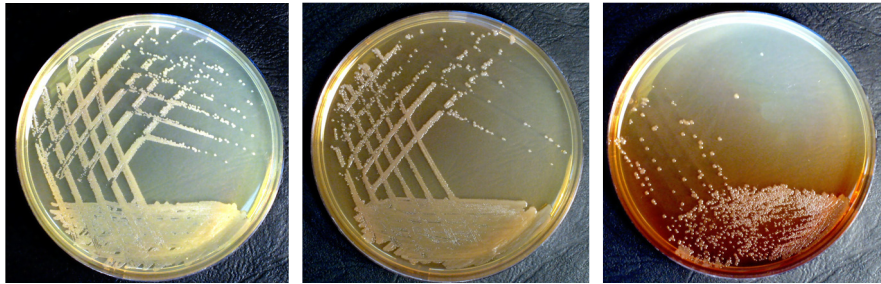
### 3.5. *Laboratorní průkaz bakterií komplexu B. cepacia*

Průkaz *Bcc* v klinickém materiálu (zejména sputu) se opírá o (i) kultivační záchyt na selektivních půdách který umožňuje předběžnou identifikaci *Bcc* a jeho odlišení od ostatních častých patogenů jako je *S. aureus* a *P. aeruginosa* a je předpokladem pro další analýzu izolátu; (ii) fenotypové diagnostické systémy zpřesňující zařazení izolátu k *Bcc* a (iii) v současnosti nejvýznamnější molekulově genetické metody, které umožňují spolehlivou druhovou identifikaci izolátu a jeho další zařazení na kmenové (poddruhové) úrovni pro epidemiologické účely (Dřevínek 2005).

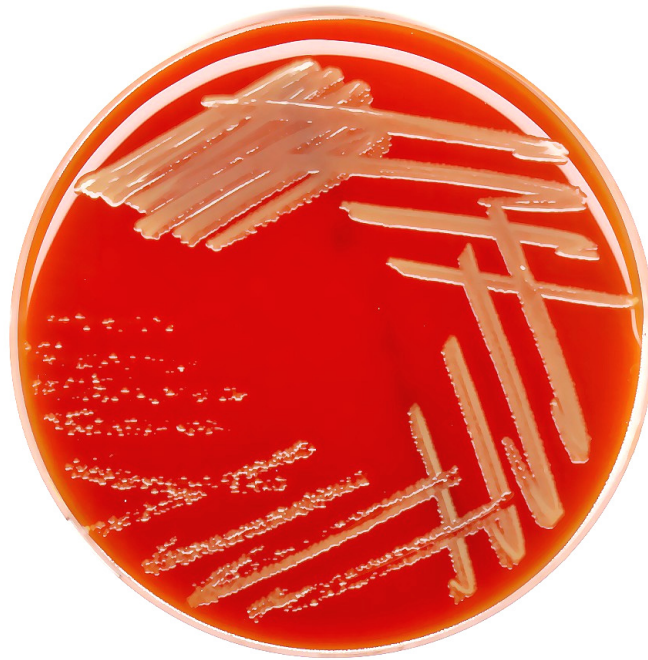
#### 3.5.1. **Kultivační metody**

Bakterie *Bcc* jsou relativně růstově nenáročné. Rostou aerobně při 20° i 37° C (růstové optimum 30° – 35° C) na základních tekutých kultivačních půdách (např. živný bujón) a pevných kultivačních půdách (např. na živném a krevním agaru). Kmeny *Bcc* rostou na agarových půdách v drobných koloniích v S fázi a mohou produkovat hnědý, zelený nebo nachový pigment (Obr. 6), případně vyvíjet nasládlý zápach. Kultivace se standardně odečítá za 72 hodin. Kultivace kmenů *Bcc* je přesto obtížná a to z důvodu poměrně pomalého růstu a riziku jejich překrytí rychleji rostoucími mikroorganismy (Gibson et al. 2003). Proto jsou doporučována selektivní media (např. *B. cepacia selective agar*, OFPBL či PC agar), jejichž senzitivita je pro kmeny *Bcc* vyšší než u konvenčních kultivačních půd. Avšak ani kultivace na selektivních půdách nezaručuje výlučnou izolaci *Bcc*. Navíc neumožňuje odlišení jednotlivých druhů náležejících do komplexu (Dřevínek 2005).





Obrázek 6. – produkce pigmentů u izolátů *Bcc*



Obrázek 7. – *B. cenocepacia* v čisté kultuře na krevním agaru

### 3.5.2. Fenotypové identifikační metody

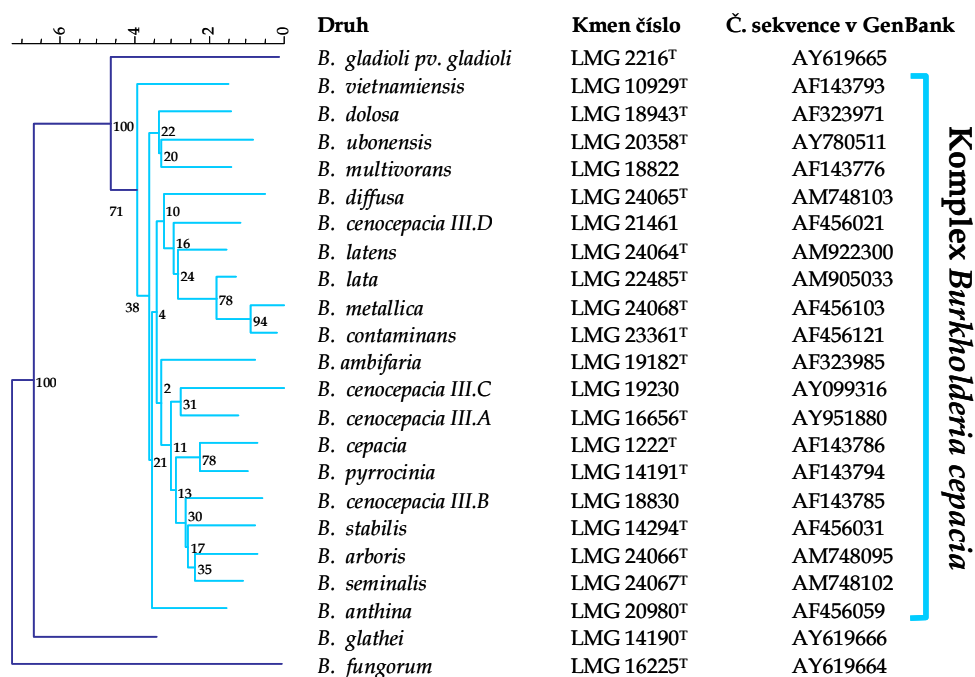
Diagnostické identifikační systémy jako API 20 NE se používají k odlišení *Bcc* od ostatních bakterií. Mají však omezenou specifitu a mohou jako *Bcc* **chybně identifikovat** tzv. *B. cepacia*-like bakterie vyskytující se u nemocných CF (např. *Burkholderia gladioli*, *Ralstonia pickettii*, *Achromobacter spp.*, *Pseudomonas spp.* či *Stenotrophomonas maltophilia*) (Gibson et al. 2003). Chyba identifikace *Bcc* v mikrobiologických laboratořích je značná: přibližně 10 % bakterií je chybně

zařazeno jako *B. cepacia* zatímco 36 % izolátů *B. cepacia* není správně identifikováno (Dřevínek 2005).

Tabulka 4. - Vybrané fenotypové znaky komplexu <i>B. cepacia</i> (Gideon online)	
Znak	Hodnota
Gramovo barvení	Negativní
Morfologie	Tyčinka - kokobacil
Metabolismus	Striktně aerobní
Růst na krevním agaru	+
Hemolýza	-
Růst na MacConkeyho agaru	+
Kataláza	+
Oxidáza	-
Oxidace glukózy	+
Tvorba indolu	-
Utilizace citrátu	+
Dnáza	-
Lipáza	+
Utilizace acetátu	+
Utilizace mukátu	+
Utilizace D-manózy	+

### 3.5.3. Molekulově-genetické identifikační metody

Spolehlivou identifikaci umožňují genotypové identifikační metody založené na průkazu specifických nukleotidových sekvencí. Zařazení izolátu do rodu *Burkholderia* a *Bcc* poskytuje sekvenční analýza genu pro **16S rRNA**. Z důvodu omezeného polymorfizmu však tato metoda neumožňuje rozlišení některých druhů *Bcc*. Pro identifikaci druhů *Bcc* lze použít průkaz genu *recA*, jehož mezidruhovná sekvenční podobnost je u *Bcc* v rozmezí 94 - 95% a dovoluje identifikovat *Bcc* jako celek a dále **RFLP** s enzymem *HaeIII* pro zařazení k jednotlivým druhům komplexu (Obr. 8) (Mahenthiralingam et al. 2002; Dřevínek 2005).



**Obrázek 8.** – Dendrogram příbuznosti všech 17 druhů komplexu *B. cepacia* a tří dalších druhů rodu *Burkholderia* podle sekvence genu *recA*. Dendrogram byl zkonstruován pomocí algoritmu *Neighbour-Joining* v programu BioNumerics verze 5.0 (Applied Maths).

### 3.5.4. Molekulově-genetické typizační metody

Pro epidemiologické účely se využívají tzv. typizační metody umožňující citlivé rozlišení na poddruhové (kmenové) úrovni. Nejčastěji jde o analýzu možného přenosu určitých kmenů mezi pacienty. Izoláty *Bcc* lze typizovat různými metodami založenými na mezikmenovém polymorfizmu DNA, např. **RAPD** (*random amplified polymorphic DNA*), makrorestrikční analýzou v pulzním elektrickém poli (PFGE, *pulsed-field gel electrophoresis*) nebo **MLST** (*multilocus sequence typing*) (Clode et al. 2000). Zatímco fingerprintingové metody RAPD a PFGE umožňují pouze porovnání právě analyzovaných izolátů metoda MLST umožňuje určení jednoznačného genomického profilu, jenž lze porovnat s údaji v mezinárodní databázi MLST (<http://pubmlst.org/bcc/>) (Mahenthiralingam et al. 2002). Shoda izolátů v MLST profilech nebo vysoká podobnost jejich RAPD nebo PFGE fingerprintů naznačuje přítomnost epidemického kmene nebo klonu (Spilker et al. 2009).

### 3.6. Epidemické klony komplexu *B. cepacia*

Prevalence infekce vyvolané *Bcc* se v **jednotlivých centrech CF významně liší** (5–40%). Vysoká prevalence přitom může být důsledkem šíření tzv. epidemických klonů. **Epidemické klony** jsou evolučně samostatné a genotypově relativně homogenní skupiny kmenů, které se zřetelně odlišují od ostatních kmenů stejného druhu a mohou se vyskytovat **v různém čase na různých místech**. Identifikace epidemických klonů má zásadní význam pro charakter epidemické situace a z něho plynoucí protiepidemická opatření (Mahenthiralingam et al. 2002).

Prvním identifikovaným epidemickým klonem byl kmen *B. cenocepacia* ET12, jenž infikoval mnoho pacientů v kanadských a britských centrech CF a jenž je asociován se zvýšenou mortalitou. V Kanadě byly kromě ET12 popsány další přenosné kmeny (epidemické klony) označené podle fingerprintového profilu RAPD jako RAPD 01, 04 a 06. Centra CF na východním pobřeží USA se potýkají s epidemickým kmenem PHDC, který byl nedávno identifikován i v Evropě. V amerických státech Michigan a Ohio je přítomen především tzv. klon Midwest. V populaci izolátů v ČR byl nalezen epidemický klon pojmenovaný CZ1 (Dřevínek et al. 2003; Dřevínek et al. 2005). I když všechny vyjmenované epidemické kmeny/klony patří k *B. cenocepacia*, liší se příslušností ke skupinám podle polymorfizmu *recA*. Kmeny ET12, RAPD 01, 02 a 06 i klon CZ1 náležejí do skupiny *recA* IIIA, PHDC a Midwest kmeny do IIIB (Dřevínek 2005). Epidemické klony se vyskytují i u dalších druhů *Bcc*, např. u *B. multivorans* (kmeny OHBM a TUL2), *B. cepacia* (DTN1) nebo *B. dolosa* (SLC6) (Dřevínek 2005).

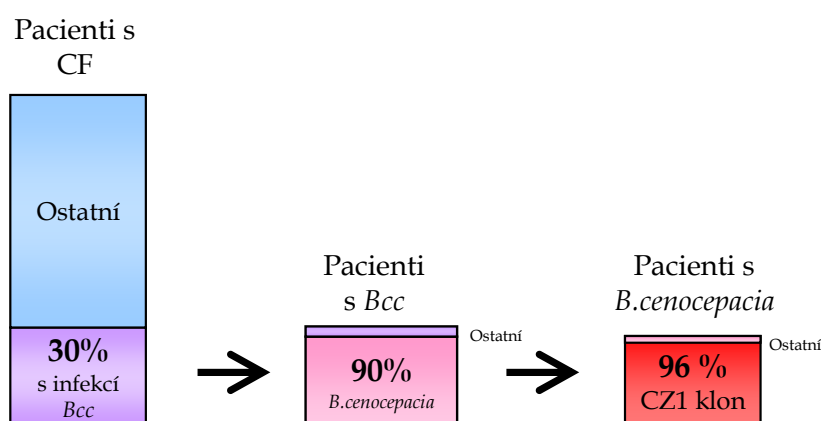
Epidemický klon se obecně považuje za **virulentnější** než sporadický kmen získaný ze zevního prostředí. Laboratorní experimenty *in vitro* např. ukázaly vyšší stupeň virulence u epidemického kmene ET12. Předchozí kolonizace pacienta s CF jiným kmenem nebo druhem *Bcc* přitom nebrání epidemickému kmeni takového pacienta osídlit, potlačit růst původního kmene a zhoršit dosavadní průběh infekce.

Epidemické klony lze prokázat na základě specifických markerů. Například u epidemického klonu ET12 byla v mikroskopickém obraze bakteriálních buněk popsána unikátní adhezivní obří vlákna o délce 2 až 4  $\mu\text{m}$ ,

označovaná jako *cable pili*, která jiné kmeny nemají. Gen *bla* kódující hlavní komponentu adhezinu obřích vláken se tak stal genetickým markerem tohoto přenosného kmene (Clode et al. 2000). Za obecnější marker epidemických kmenů se považuje úsek DNA známý jako **BCESM**, který v sobě zahrnuje gen kódující negativní regulátor transkripce (*esmR*) a je součástí většího celku - genomového ostrova patogenity (Dřevínek 2005). Ani BCESM však není univerzální genetický marker epidemických kmenů. Příkladem jsou kmeny PHDC a Midwest, které nemají ani na jeden z výše popsaných markerů. *Cla* ani BCESM proto nelze považovat za jednoznačné indikátory epidemických klonů. (McDowell et al. 2004).

### 3.6.1. CZ1 klon

V České republice je v současné době velmi rozšířen **epidemický klon** *B. cenocepacia* CZ1 sdílený většinou pacientů s infekcí *Bcc*. Jde o BCESM pozitivní, *bla* negativní klon, označený podle výsledků MLST jako ST-32, jehož fingerprintový profil se velmi podobá profilu kanadskému epidemickému kmeni RAPD 01 (Dřevínek et al. 2005). Značné rozšíření tohoto kmene v populaci českých pacientů je zřejmě důsledkem **pozdního zavedení přísných preventivních opatření** v českých centrech CF (viz kapitola 4.). V současné době je z 30% pacientů s CF infikovaných *Bcc* zhruba 90% infikováno *B. cenocepacia* *recA* skupiny IIIA a z toho 96% CZ1 klonem viz obrázek (Dřevínek et al. 2005).



**Obrázek 9.** – Infekce CZ1 klonem v populaci českých pacientů (Dřevínek 2005)

## 4. *Prevence infekce bakteriemi komplexu B. cepacia*

Infekce způsobené bakteriemi *Bcc* představují pro pacienty s CF smrtelné riziko (Gibson et al. 2003) umocněné existencí epidemických klonů, jenž se snadno šíří mezi pacienty i jednotlivými centry CF (McDowell et al. 2004). Proto se v současnosti centra CF řídí podrobnými směrnicemi, jejichž cílem je **zabránit přenosu kmenů *Bcc*** (O'Malley 2009).

### 4.1. *Historie preventivních opatření*

První zmínky o bakteriích *Bcc* v souvislosti s CF jsou datovány na přelom 70. a 80. let minulého století. Bakterie začaly být záhy považovány za nebezpečná infekční agens, které jsou primárně rezistentní k většině antibiotik a které mohou způsobovat u CF pacientů smrtící septický stav s nekrotizující pneumonií. V roce 1990 bylo prokázáno, že se **bakterie mezi pacienty přenáší**. Tento přenos se může uskutečnit přímou cestou (mezilidským kontaktem), nepřímou cestou (prostřednictvím kontaminovaných předmětů nebo materiálů) nebo prostřednictvím kapének (O'Malley 2009).

Toto zjištění přineslo zásadní zlom v péči o pacienty s CF. Do této doby se pacienti běžně setkávali v průběhu léčby i během pravidelných prohlídek ve specializovaném centru, tyto vazby mezi pacienty dále rozvíjely specializované společnosti sdružují pacienty s CF, které mnohdy nabízely bohatý sociální program. V ČR byly např. konány **pravidelné letní tábory** pro dětské pacienty s CF, což vedlo k značnému rozšíření infekcí způsobených *Bcc*, konkrétně klonem *B. cenocepacia* CZ1. Značná prevalence infekce tímto klonem v populaci českých pacientů je důsledkem proběhlé epidemie (Dřevínek et al. 2005). Pod vlivem nových poznatků bylo potřeba tuto **zavedenou praxi změnit** a zavést pro pacienty s CF **přísný hygienicko-epidemiologický režim**, v ČR platný až od roku 1997 (O'Malley 2009; Dřevínek 2005).

### 4.2. *Současná preventivní opatření*

Ve specializovaných centrech CF po celém světě v současné době platí přísný režim odděleného sledování pacientů podle jejich mikrobiologického nálezu, s cílem zabránit možnému šíření infekce (O'Malley 2009). Paralelně se zaváděním hygienicko-epidemiologických opatření se klade velký důraz i na

časnou a spolehlivou diagnostiku infekce a na provádění molekulárně epidemiologických šetření s cílem zmapování epidemiologické situace v centru (McDowell et al. 2004; Dřevínek 2005). Je potřeba dodržovat **přísný režim separace nemocných s infekcí *Bcc*** a neinfikovaných pacientů a to zvláště tam, kde je molekulově genetickými metodami potvrzena přítomnost epidemického kmene (Dřevínek 2005). V praxi to znamená dbát na přísný hygienicko-epidemiologický režim v rámci centra CF i dalších pečujících zdravotnických zařízeních a **zabránit tak kontaktu** nejen mezi neinfikovanými a infikovanými pacienty, ale i mezi těmi, již jsou infikováni různými mikroorganismy, např. pseudomonádami nebo *Bcc*. V současnosti se uvažuje o novém pravidle, zahrnujícím vzájemnou izolaci pacientů s odlišnými kmeny *Bcc* (O'Malley 2009).

V **léčebné péči** se klade důraz na umístění pacientů na jednolůžkovém pokoji a vhodné prostorové rozmístění pokojů, sociálních zařízení a ošetřoven zvláště pro infikované a neinfikované pacienty. V ošetřovatelské péči hrají hlavní význam standardní preventivní opatření, spočívající zejména v používání jednorázových bariérových pomůcek a hygieně rukou (O'Malley 2009).

V **ambulantní péči** se pravidelné kontroly, přístrojová vyšetření a rehabilitace nemocných infikovaných kmeny *Bcc* realizují v jiný den, na konci dne nebo v jiném místě než kontroly a vyšetření pacientů infikovaných pseudomonádami nebo pacientů neinfikovaných. Pacienti jsou rovněž povinni od okamžiku vstupu do nemocnice nosit jednorázovou roušku (Dřevínek 2005). Prostory navštěvované infikovanými pacienty jakož i přístroje a pomůcky s nimiž se setkají podléhají **přísnějšímu dezinfekčnímu režimu** s vyloučením těch dezinfekčních prostředků, které nejsou dostatečně účinné proti *Bcc* a jím tvořeného biofilmu (O'Malley 2009).

V domácí léčebné péči je pak nezbytné aby měl každý pacient svůj **vlastní inhalátor**, který musí udržovat v maximální čistotě a pravidelně dezinfikovat (CF klub). Velký důraz se rovněž klade na edukaci pacientů a jejich rodin (O'Malley 2009).

Přísným pravidlům podléhají případné společenské akce a další sociální styk pacientů s CF. Pacienti jsou důkladně informováni o svém současném mikrobiologickém nálezu a rizicích, které z toho vyplývají pro ně a osoby v jejich okolí. Určitou výjimku tvoří například pacienti sourozenci u kterých, režim

přísné separace dodržovat nelze. S ohledem na to u nich často dochází k infekci stejným kmenem (Dřevínek 2005).

Současné výsledky ukazují, že v řadě CF center **po zahájení striktního oddělování pacientů** kolonizovaných *Bcc* od ostatních pacientů **významně klesla incidence infekcí** (Razvi et al. 2009; Dřevínek 2005).

#### 4.3. *Management pacientů s infekcí Bcc*

Cílem managementu CF pacientů s potvrzenou infekcí *Bcc* je udržet pacienta v co nejlepším klinickém stavu a v rámci možností zabránit progresi plicního postižení (Gibson et al. 2003). Pacienty se vyšetřují v 1 - 3 měsíčních intervalech, pokud možno každý měsíc. Každá kontrola zahrnuje rutinní klinické vyšetření, kontrolu váhy, oxymetrii, vyšetření funkce plic a vyšetření sputa nebo výtěrů z horních cest dýchacích. Kontroluje se medikace, každá změna se podrobně rozebere s rodiči případně s pacientem a sdělí lékaři v místě bydliště (CF klub). Antimikrobní léčba *Bcc* infikovaných pacientů se nasazuje vždy, při objevení i těch nejdiskrétnějších příznaků aktivní infekce a to minimálně na 14 dní (Caparro et al. 2001; Dřevínek 2005).

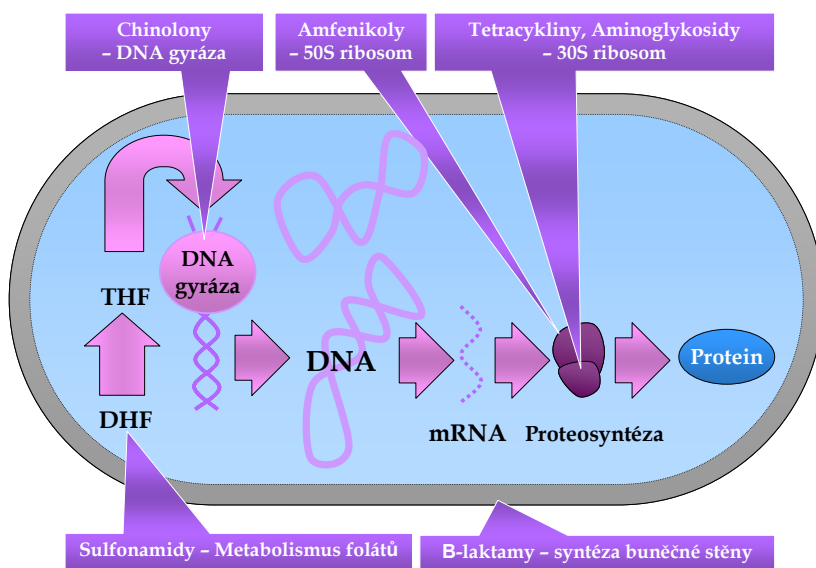
#### 4.4. *Antimikrobní léčba*

Antimikrobní léčba infekcí bakteriemi *Bcc* je obtížná, neboť tyto bakterie jsou **přírodně rezistentní k celé řadě antibiotik**, což významně zužuje šíři použitelných léků (Rose et al. 2009). Citlivost klinického izolátu k antibiotikům se v běžné klinické praxi vyšetřuje pomocí diskové difuzní metody a určení MIK, na jejichž základě se určí, zda je izolát k testovanému antibiotiku citlivý nebo rezistentní. U pacientů s CF se však v antimikrobní léčbě uplatňuje celá řada dalších faktorů, které výrazně modifikují odpověď infikovaného pacienta na léčbu (Gibson et al. 2003). Bakterie se v dýchacích cestách nemocných vyskytují v silné vrstvě vazkého hlenu, navíc v **obrovském množství a značné denzitě** (Govan 2006) a **vytvářejí biofilm** který významně snižuje průnik antimikrobní látky (Caraher et al. 2007). Proto se v centech CF od testování citlivosti izolátů k antimikrobním látkám ustupuje a využívají se spíše speciálně vytvořené protokoly empirické terapie zohledňující epidemiologickou situaci v místě (Govan 2006).



#### 4.4.1. Antimikrobní látky účinné proti *Bcc*

Léčba infekce *Bcc* u pacienta s CF je vždy indikována zkušeným klinickým lékařem CF centra (pediatrem nebo pneumologem) ve spolupráci s klinickým mikrobiologem a posuzuje se z několika hledisek, zejména na základě dlouhodobých i aktuálních **výsledků kultivace** u pacienta, jeho aktuálním klinickým stavu i zkušeností s léčbou dalších pacientů infikovaných stejným kmenem (Govan 2006). Většinou se používá **dvoj- nebo trojkombinace účinných i méně účinných antimikrobních látek**, a to v dávkách vyšších než je u dané látky obvyklé (Fila 2007). Právě kombinace antibiotik ve vyšším dávkování je u infekcí *Bcc* jedinou možností jak dosáhnout přijatelného účinku. Obvykle se kombinují  $\beta$ -laktamová antibiotika, zejména cefalosporiny III. generace, protipseudomonádové peniciliny nebo karbapenemy s aminoglykozidy, tetracykliny, chinolony nebo kotrimoxazolem (Rose et al. 2009). Cílem je zasáhnout bakteriální buňku na několika úrovních, tedy při syntéze buněčné stěny, tvorbě nukleové kyseliny nebo proteosyntéze (Dales et al. 2009).



Obrázek 109. – Schéma účinku antimikrobních látek na *Bcc*

Léčba musí trvat minimálně dva týdny a kritériem úspěšnosti není kultivační negativita, které lze u pacientů infikovaných CF dosáhnout jen vzácně, ale zlepšení klinické odpovědi (Govan 2006). **Použitelné antimikrobní preparáty**, jejich kombinace a empirickou léčbu udávají tabulky 5a., 5b. a 5c.

Změny ve stávající terapii závisí na klinické odpovědi, výsledcích vyšetření citlivosti u daného izolátu, alergické reakci pacienta a zkušeností s předchozími kombinacemi antimikrobních látek (Gibson et al. 2003; Fila 2007).

Tabulka 5a. - Účinná antibiotika (Fila 2007)			
Antibiotikum	Skupina	Citlivost <i>Bcc</i>	Mechanismus účinku
Piperacilin /tazobaktam	Protipseudomonádový penicilin + inhibitor $\beta$ -laktamáz	Primárně citlivá	Zábrana syntézy buněčné stěny
Ceftazidim	Cefalosporin III. generace	Primárně citlivá	Zábrana syntézy buněčné stěny
Cefoperazon /sulbaktam	Cefalosporin III. generace + inhibitor $\beta$ -laktamáz	Primárně citlivá	Zábrana syntézy buněčné stěny
Meropenem	Karbapenem	Primárně citlivá	Zábrana syntézy buněčné stěny
Aztreonam	Monobaktam	Primárně citlivá	Zábrana syntézy buněčné stěny
Kotrimoxazol	Sulfonamid + diaminopyrimidin	Primárně citlivá	Inhibice metabolismu
Chloramfenikol	Amfenikol	Primárně citlivá	Inhibice metabolismu
Doxycyklin	Tetracyklin	Citlivá při použití laktoferinu	Inhibice proteosyntézy
Minocyklin	Tetracyklin	Citlivá při použití laktoferinu	Inhibice proteosyntézy
Rifampicin	Rifamycin	Citlivá při použití laktoferinu	Inhibice RNA polymerázy
Tobramycin	Aminoglykozid	Rezistentní (používá se v kombinacích)	Inhibice proteosyntézy
Amikacin	Aminoglykozid	Rezistentní (používá se v kombinacích)	Inhibice proteosyntézy
Ciprofloxacin	Chinolon	Rezistentní (používá se v kombinacích)	Inhibice DNA gyrázy

Tabulka 5b. - Terapeutické kombinace používané v současné době ve FN Motol (Fila 2007)	
Monoterapie	Kombinace perorální (p.o.) a inhalační léčby
p.o. doxycyklin	2 ATB z: kotrimoxazol ciprofloxacín inhalačně vysokodávkovaný tobramycin
p.o. kotrimoxazol	inhalačně vysokodávkovaný tobramycin + kotrimoxazol
inhalačně vysokodávkovaný tobramycin	inhalačně vysokodávkovaný tobramycin + ciprofloxacín
	kotrimoxazol + ciprofloxacín
Kombinace s i.v. preparátem:	
2-3 kombinace z 1-2 betalaktamů a 1-2 dalších antibiotik/chemoterapeutik	
piperacilin/tazobaktam ceftazidim cefoperazon/sulbaktam meropenem aztreonam piperacilin/tazobaktam + meropenem ceftazidim + meropenem cefoperazon/sulbaktam + meropenem	+ amikacin (nebo inhalačně vysokodávkovaný tobramycin) ciprofloxacín + tobramycin nebo amikacin (nebo inhalačně vysokodávkovaný tobramycin) kotrimoxazol + ciprofloxacín ciprofloxacín + rifampicin

Tabulka 5c. - Běžná empirická léčba dle závažnosti infekce (Fila 2007)		
Běžná léčba lehčí exacerpace (ambulantně):	Běžná počáteční léčba těžší exacerpace	Běžná počáteční léčba nejtěžší exacerpace
p.o. tetracyklin p.o. kotrimoxazol	i.v. ceftazidim + p.o. kotrimoxazol	i.v. ceftazidim + i.v. meropenem + inhalačně vysokodávkovaný tobramycin

#### 4.4.2. Predikce účinku antimikrobních látek

Predikce účinku antimikrobní léčby je u infekcí vyvolaných kmeny *Bcc* obtížná. Různé kmeny mají odlišné profily rezistence, populace téhož kmene může být heterorezistentní a výsledek testu *in vitro* nemusí poskytovat spolehlivou informaci o účinku antimikrobní látky *in vivo*, kde se uplatňují další vlivy např. tvorba biofilmu. Laboratorně se stanovuje **minimální inhibiční koncentrace** (MIK), tedy minimální koncentrace antibiotika, která zabrání viditelnému růstu bakteriálních kolonií *in vitro* (MacKenzie et al. 2004) a to

obvykle na planktonických buňkách. MIK u buněk rostoucích ve formě biofilmu může být vyšší, proto se zvažuje **testování buněk rostoucích ve formě biofilmu**, které může poskytnout přesnější informaci o MIK *in vivo* (Caraher et al. 2007, Davies & Bilton 2009). U vybraných antimikrobních látek se vyšetřuje MIK v prostředí obsahujícím laktoferin, který zvyšuje citlivost *Bcc* k některým látkám. U antimikrobních léčiv, vůči nimž je izolát *Bcc* rezistentní a jež se používají v kombinacích, se MIK nezjišťuje (Caraher et al. 2007).

#### 4.5. Dezinfekce

Nenahraditelnou roli v prevenci infekcí vyvolaných bakteriemi *Bcc* má dezinfekce. Dezinfekce je definována jako selektivní eliminace nežádoucích mikroorganismů vedoucí k zamezení jejich přenosu (Melicharčíková 1998). Nejčastější jsou metody chemické nebo kombinované fyzikálně-chemické dezinfekce, které se používají k dezinfekci kontaminovaných povrchů, diagnostických či léčebných přístrojů a v neposlední řadě dezinfekci rukou (O'Malley 2009).

Nejzávažnější překážkou účinné aplikace dezinfekce v uvedených oblastech je schopnost *Bcc* **přežít ve vnějším prostředí a tvořit biofilm** (Zuckerman et al. 2009). Bakterie obvykle lépe přežívají při vyšších hodnotách relativní vlhkosti. Přežití bakterií může pozitivně ovlivnit i ochranné médium (např. krev). Kmeny *Bcc* mohou vytvářet na pevných površích biofilm, který výrazně snižuje citlivost bakterií k dezinfekčním látkám (Caraher et al. 2007). Problémem je i značná primární **rezistence *Bcc* k dezinfekčním látkám**, která omezuje účinnost řady dezinfekčních prostředků použitých v obvyklých koncentracích (Zuckerman et al. 2009).

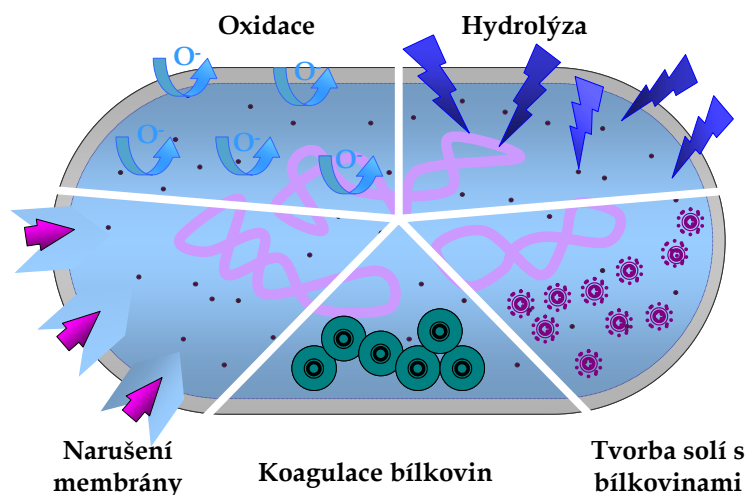
Účinek chemické dezinfekce povrchů závisí na koncentraci a době působení prostředku, množství a rezistenci kontaminujících kmenů a podmínkách prostředí. Pro dezinfekci povrchů lze použít řadu komerčně dostupných prostředků s několika typy účinných látek jako jsou alkoholy, halogeny, kvartérní amoniové sloučeniny, fenoly nebo glutaraldehyd. Dezinfekční prostředky pro povrchovou dezinfekci se používají pro stírání pracovních povrchů, ostatních povrchů včetně podlah a stěn a některých používaných přístrojů a zařízení (Melicharčíková 1998).

Závažnějším problémem je dezinfekce diagnostických (spirometry) a léčebných (inhalátory a ventilátory) přístrojů, které nelze sterilizovat běžně dostupnými metodami. Tyto přístroje mívají složitý vnější i vnitřní povrch, který bývá kontaminován značným množstvím bakterií. Použité dezinfekční prostředky přitom nemohou být **příliš agresivní**, aby nedošlo k poškození přístroje. V těchto situacích se obvykle se používají alkoholy, kvartérní amoniové sloučeniny a aldehydy (Melicharčíková 2007).

Specifickou kapitolu představuje dezinfekce rukou, v současné době založená zejména na alkoholových dezinfekčních prostředcích. Při dezinfekci rukou nehraje roli pouze kvalita provedené dezinfekce, ale i četnost a pravidelnost prováděných dezinfekcí v souladu s moderními poznatky o prevenci nozokomiálních nákaz. Dezinfekci rukou má lékařský i ošetřovatelský personál provádět vždy při vstupu do místnosti s pacientem, před kontaktem s pacientem, před aseptickým zákrokem, po kontaktu s biologickým materiálem a při odchodu z místnosti (Melicharčíková 2007; Kac et al. 2009).

#### 4.5.1. Dezinfekční látky účinné proti komplexu *B. cepacia*

Narozdíl od většiny antimikrobních látek není účinek dezinfekčních látek přesně zacílený na konkrétní bakteriální strukturu. Základem účinku jsou procesy vedoucí k **ireverzibilní denaturaci bílkovin v buňce** (oxidací, hydrolýzou, koagulací, případně tvorbou solí), narušení integrity bakteriální stěny nebo cytoplazmatické membrány (Melicharčíková 1998).



Obrázek 11. – Schéma účinku dezinfekčních látek na *Bcc*

Bakterie *Bcc* jsou proti dezinfekčním látkám **odolné na základě nespecifických dějů** mezi něž patří vyšší odolnost ke stresujícím faktorům ve vnějším prostředí a schopnost dlouhodobého přežívání a (Caraher et al. 2007; Zuckerman et al. 2009). Roli hrají i další mechanismy mezi něž patří tvorba biofilmu a vyšší rezistence vůči antimikrobním látkám (Smith & Hunter 2008).

Jako nejúčinnější se proti kmenům *Bcc* uplatňují silná **oxidační činidla** na bázi chloru a **aldehydy** (Peeters et al. 2008). Za středně účinné se považují alkoholy a některé organické sloučeniny např. kvarterní amoniové soli (KAS). V ředěných roztocích KAS jsou některé izoláty *Bcc* schopny dlouhodobě přežít a dokonce se množit (Rose et al. 2009). Přehled vybraných účinných látek uvádí tabulka 6.

Tabulka 6. - Vybrané dezinfekční látky				
Dezinfekční látka	Chemický název	Skupina	Mechanismus účinku	Použití v dezinfekci
Chlornan sodný	Chlornan sodný (NaClO)	Oxidační činidlo	Oxidace	Povrchů
Chloramin B	Sodná sůl N-chlorbenzen-sulfonamidu	Oxidační činidlo	Oxidace	Povrchů
Jodonal A	KI + NaI + ethylenoxid-nonylfenol	Jodofor	Oxidace	Pokožka a sliznice
Glutaraldehyd	Glutaraldehyd	Aldehyd	Koagulace bílkovin	Nástrojů a přístrojů
Kyselina peroctová	Kyselina peroxyoctová	Kyselina	Hydrolýza	Povrchů
Chlorhexidin	Chlorhexidin diglukonát	Biguanid	Narušení membrány	Pokožka a sliznice
Benzalkonium bromid	Benzildodecyl-dimethylamonium-bromid	KAS	Narušení membrány	Pokožka
Isopropanol	2-propanol	Alkohol	Koagulace bílkovin	Pokožka

#### 4.5.2. Predikce účinků dezinfekčních látek

Kvantifikace účinku dezinfekční látky na konkrétního mikroba je obtížná. Účinek látky na bakterie je dán vlastnostmi obsažené účinné látky, fyziologickým stavem bakterií a fyzikálními a chemickými vlastnostmi prostředí. Dezinfekční látka musí mít **ireverzibilní letální účinek**, kterého dosahuje obvykle v průběhu

několika minut (Cremieux et al. 2001). V případě rychle působících baktericidních činidel dojde k redukci bakteriální populace o 99,9 % již v průběhu jedné až dvou minut. Pro redukci bakteriální populace o 99,999 % (tj. o 5 řádů) je obvykle potřeba doba expozice 5 až 15 minut. Pokud přežije významná část bakteriální populace, je dezinfekce neúčinná a hrozí riziko, že dojde k **selekcí nežádoucích nebo rezistentních druhů** (Melicharčíková 1998; Cremieux et al. 2001).

Laboratorně se může stanovit **minimální inhibiční koncentrace** (MIK), která poskytuje informaci o míře účinku dezinfekční látky na konkrétní kmen (Rose et al. 2009). Pro praktické účely se však upřednostňuje stanovení minimální baktericidní koncentrace (MBK) v suspenzních nebo povrchových expozičních testech v definovaném čase (Peeters et al. 2008). Tyto testy poskytují informaci nejen o účinné koncentraci dezinfekční látky, které má být reálně dosaženo, ale i o rychlosti účinku látky na mikroba. Mezi další možnosti zpřesňující *in vitro* predikci účinku patří testování za použití interferujícího činidla a zvýšené teploty (Cremieux et al. 2001, Sattar 2006), případně testování účinku proti buňkám narostlým ve formě biofilmu (Smith & Hunter 2008).

V průběhu samotného dezinfekčního procesu je nutné podle *in vitro* zjištěných skutečností dodržet účinné koncentrace dezinfekční látky v účinném expozičním čase (Sattar 2006; Melicharčíková 2007; Smith & Hunter 2008).

## **Experimentální část: Citlivost epidemického klonu *B. cenocepacia* CZ1 k antimikrobním a dezinfekčním látkám**

### ***Úvod a cíl práce***

Značné rozšíření epidemického klonu *B. cenocepacia* CZ1 v populaci českých pacientů s CF představuje závažný epidemiologický a léčebný problém. I když po zavedení přísných hygienických opatření incidence infekce poklesla, prevalence je stále vysoká a infikováno je přibližně 26% pacientů v péči centra CF ve FN Motol (Dřevínek et al. 2005). V budoucím managementu kontroly infekce v CF centru bude hrát velkou roli účinná antimikrobní terapie u infikovaných pacientů i hygienicko-epidemiologická opatření, včetně účinného dezinfekčního režimu chránící pacienty dosud neinfikované. Cílem této práce bylo získat dosud chybějící informaci o citlivosti epidemického klonu CZ1 k vybraným antimikrobním a dezinfekčním látkám.

### ***Metodika***

#### **Vyšetřované kmeny**

Kmeny reprezentující českou populaci epidemického klonu *B. cenocepacia* CZ1 izolované od pacientů s CF byly vybrány ve spolupráci s Laboratoří molekulární genetiky Pediatrické kliniky ve Fakultní nemocnici v Motole, v níž se archivují dosud izolované kmeny. Tyto kmeny byly již dříve vyšetřeny molekulově genetickými identifikačními a typizačními metodami. Celkem bylo vyšetřeno 11 izolátů od různých pacientů z let 1998-2009 a 4 referenční kmeny, tj. *B. cenocepacia* J2315 a LMG 16656, *B. multivorans* LMG 14294 a *B. stabilis* LMG 16660 (Tabulka 7). Kmeny byly uchovávány při -20°C a před použitím vyočkovány na MH agar (Oxoid) a kultivovány 48 hodin při 30°C.



Tabulka 7. - Studované bakteriální kmeny				
Kmen	Druh	MLST	Sbírkové číslo	Klonální příslušnost
X127	<i>B. cenocepacia</i> 3A	ST-32		CZ1 klon
457	<i>B. cenocepacia</i> 3A	ST-32		CZ1 klon
459	<i>B. cenocepacia</i> 3A	ST-32		CZ1 klon
460	<i>B. cenocepacia</i> 3A	ST-32		CZ1 klon
463	<i>B. cenocepacia</i> 3A	ST-32		CZ1 klon
573	<i>B. cenocepacia</i> 3A	ST-32		CZ1 klon
817	<i>B. cenocepacia</i> 3A	ST-32		CZ1 klon
1232	<i>B. cenocepacia</i> 3A		CCM7291	CZ1 klon
5420	<i>B. cenocepacia</i> 3A			CZ1 klon
6064	<i>B. cenocepacia</i> 3A			CZ1 klon
6183	<i>B. cenocepacia</i> 3A			CZ1 klon
6184	<i>B. cenocepacia</i> 3A			CZ1 klon
14294	<i>B. stabilis</i>		LMG14294	
16656	<i>B. cenocepacia</i> 3A		LMG16656	Klon J2315
16660	<i>B. multivorans</i>		LMG16660	

### Vyšetření citlivosti k antimikrobním látkám

Byla vyšetřena citlivost k těmto 15 antimikrobním látkám: amikacin, cefepim, ceftazidim, ciprofloxacín, chloramfenikol, doxycyklin, gentamicin, imipenem, kotrimoxazol, meropenem, minocyklin, piperacilin, piperacilin-tazobaktam, temocilin a tobramycin. Citlivost ke všem látkám byla určena pomocí diskového difuzního testu podle doporučení *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI 2005) a u vybraných látek (ceftazidim, ciprofloxacín, chloramfenikol, doxycyklin, kotrimoxazol, meropenem, piperacilin, minocyklin, temocilin a tobramycin) byla vyšetřena MIK pomocí Etestu (Biomérieux). U ceftazidimu a meropenemu byla MIK stanovena také agarovou diluční metodou. Izoláty byly klasifikovány jako citlivé, intermediárně citlivé nebo rezistentní podle hraničních koncentrací CLSI (2005).

### Vyšetření citlivosti k dezinfekčním látkám

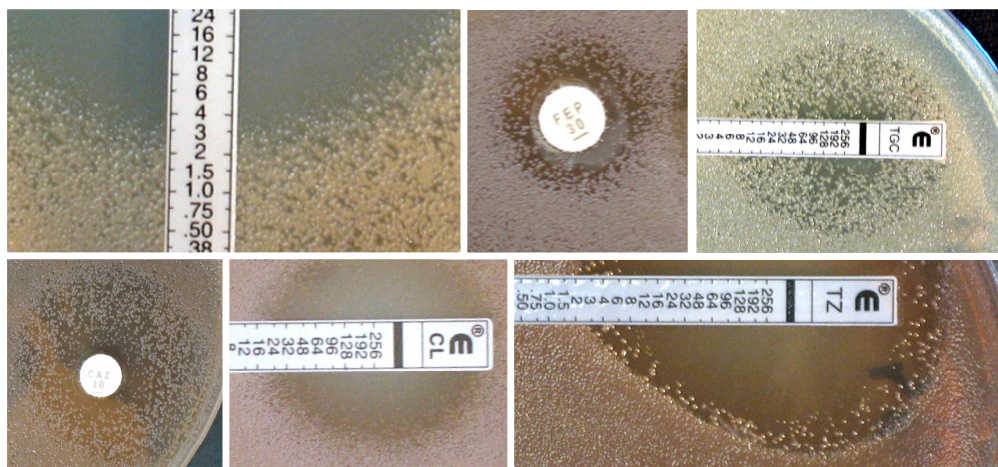
Citlivost k osmi dezinfekčním látkám (benzalkonium bromid, ethanol, chlornan sodný, chloramin B, chlorhexidin, glutaraldehyd, isopropanol, jodonal A a kyselina peroctová) byla vyšetřena určením MIK pomocí diluční metody v bujónu (Rose et al. 2009) a stanovením MBK suspenzní metodou v středním expozičním čase 15 minut při 20°C bez použití interferujícího činidla (Cremieux

et al. 2001). Izoláty byly klasifikovány jako citlivé pokud výsledky stanovení citlivosti k dezinfekčním látkám ani v jedné z obou použitých metod nepřesáhly nejnižší doporučenou koncentraci.

## *Výsledky a diskuze*

### **Citlivost k antimikrobním látkám**

Podrobné výsledky vyšetření citlivosti k antimikrobním látkám uvádějí tabulky 8 (diskový difuzní test) a 9 (stanovení MIK Etestem a agarovou diluční metodou). Výsledky pak shrnuje tabulka 10. Odečet hranic inhibiční zóny v diskovém difuzním testu a Etestu byl v řadě případů problematický a to z důvodu výskytu drobných kolonií v oblasti inhibiční zóny nebo přítomnosti dvou různě citlivých subpopulací (dvě inhibiční zóny) viz obrázek. Jednoznačnější výsledky poskytla agarová diluční metoda, která je standardem při vyšetření antimikrobní citlivosti. Srovnání kvalitativních výsledků získaných různými metodami vyšetření citlivosti nicméně ukázalo poměrně dobrou shodu.



**Obrázek 12.** - Příklady problémů při odečtu hranic inhibiční zóny v diskovém difuzním testu a Etestu

Tabulka 8. - Vyšetření citlivosti k antimikrobním látkám diskovou difuzní metodou (průměr zón v mm)

Kmen	Meropenem	Imipenem	Ceftazidim	Cefepim	Piperacilin	Piperacilin + tazobactam	Kotrimoxazol	Chloramfenikol	Ciprofloxacín	Tigecyklin	Doxycyklin	Tobramycin	Amikacin	Gentamicin
<i>Break-point pro rezistenci a citlivost</i>	≤15 ≥20 *	≤13 ≥16 **	≤17 ≥21 *	≤14 ≥18 **	≤17 ≥18 **	≤17 ≥18 **	≤10 ≥16 *	≤18 ≥18 ***	≤15 ≥21 **	≤12 ≥16 ****	≤12 ≥16 **	≤12 ≥15 **	≤14 ≥17 **	≤12 ≥15 **
<b>X127</b>	16	9	28	6	20	24	6	6	6	6	6	6	6	6
<b>457</b>	24	13	31	8	31	34	6	6	6	6	6	6	6	6
<b>459</b>	17	6	22	6	23	24	6	6	6	9	6	6	6	6
<b>460</b>	15	9	28	6	22	27	6	6	6	8	6	6	6	6
<b>463</b>	19	14	32	6	29	34	6	6	13	22	6	6	6	6
<b>573</b>	15	9	21	6	19	22	6	6	6	6	6	6	6	6
<b>817</b>	11	9	9	6	9	11	6	6	6	6	6	6	6	6
<b>1232</b>	12	10	8	6	11	12	6	6	6	9	6	6	6	6
<b>5420</b>	15	9	9	6	12	13	6	6	6	20	6	6	6	6
<b>6064</b>	18	10	32	6	26	28	6	6	6	6	6	6	6	6
<b>6183</b>	10	14	8	6	13	14	6	6	6	6	6	6	6	6
<b>6184</b>	17	15	30	6	26	30	6	6	6	6	6	6	6	6
<b>14294</b>	27	20	34	15	32	36	6	6	6	21	9	6	6	6
<b>16656</b>	8	6	8	6	8	9	6	10	8	6	11	6	6	6
<b>16660</b>	20	38	9	6	24	36	17	10	8	6	16	6	6	6

Breakpointové hodnoty platné \* pro *B. cepacia*; \*\* pro *P. aeruginosa*; \*\*\* pro *Enterobacteriaceae*, \*\*\*\* pro nedostatek údajů jako doxycyklin

Tabulka 9. - Vyšetření MIK vybraných antimikrobních látek Etestem a Agarovou diluční metodou (mg/l)													
ATB	Meropenem	Meropenem	Ceftazidim	Ceftazidim	Piperacilin	Temocilin	Kotrimoxazol	Chloramfenikol	Ciprofloxacín	Tigecyklin	Doxycyklin	Tobramycin	Amikacin
Break-point pro rezistenci a citlivost	≥16	≥16	≥32	≥32	≥128	≥8	≥4	≥32	≥4	≥8	≥16	≥16	≥64
	≤4 **	≤4 *	≤8 **	≤8 *	≤64 **	≤4 ***	≤2 **	≤8 **	≤1 **	≤2 **	≤4 **	≤4 **	≤16 **
Metoda	Etest	Agar	Etest	Agar	Etest	Etest	Etest	Etest	Etest	Etest	Etest	Etest	Etest
<b>X127</b>	≥ 16	16	6	32	256	4	8	256	≥ 32	≥ 256	≥ 256	≥ 256	≥ 256
<b>457</b>	6	4	2	8	24	24	≥ 8	256	≥ 32	≥ 256	≥ 256	≥ 256	≥ 256
<b>459</b>	16	8	6	16	64	4	16	256	32	48	≥ 256	128	≥ 256
<b>460</b>	≥ 24	16	4	16	≥ 256	4	3	256	≥ 32	32	≥ 256	≥ 256	≥ 256
<b>463</b>	12	8	3	16	64	48	≥ 32	256	8	4	≥ 256	32 - 48	≥ 256
<b>573</b>	12	16	6	64	≥ 256	6	1	256	≥ 32	≥ 256	≥ 256	≥ 256	≥ 256
<b>817</b>	≥ 32	32	96	128	≥ 256	8	1,5	96	32	≥ 256	≥ 256	≥ 256	≥ 256
<b>1232</b>	≥ 32	32	128	≥ 128	≥ 256	48	≥ 32	256	32	48	≥ 256	≥ 256	≥ 256
<b>5420</b>	16	16	32	64	≥ 256	4	8	24	≥ 32	4	≥ 96	≥ 256	≥ 256
<b>6064</b>	16	8	3	16	12	4	4	256	32	64	≥ 256	256	≥ 256
<b>6183</b>	≥ 32	16	256	128	≥ 256	64	3	256	≥ 32	96	≥ 256	≥ 256	≥ 256
<b>6184</b>	16	8	8	16	12	4	1	256	≥ 32	≥ 96	≥ 256	≥ 256	≥ 256
<b>14294</b>	2	8	2	64	3	3	12	64	≥ 32	8	32	96	≥ 256
<b>16656</b>	≥ 32	32	32	64	256	16	≥ 32	256	32	≥ 256	≥ 96	192	≥ 256
<b>16660</b>	6	4	≥ 256	≥ 128	≥ 256	12	0,25	48	32	48	8	128	≥ 256

Hraniční hodnoty podle \*CLSI pro *B. cepacia* a \*\* Etestu (Biomérieux); \*\*\* provizorní hodnota.

Izoláty klonu *B. cenocepacia* CZ1 byly bez výjimky rezistentní k amikacinu, gentamicinu, tobramycinu, doxycyklinu, ciprofloxacínu a cefepimu a s výjimkou jednoho nebo dvou izolátů rezistentní k chloramfenikolu a tigecyklinu. Oproti tomu zhruba polovina izolátů byla citlivých k meropenemu, ceftazidimu, piperacilinu, piperacilinu s tazobactamem a temocilinu. U těchto látek lze tudíž uvažovat o klinickém použití založeném na předchozím vyšetření citlivosti in vitro. Jejich klinická účinnost je však i v těchto případech nejistá a to vzhledem k poměrně vysokým hodnotám MIK, které - byť jsou v oblasti citlivosti - se blíží hraniční hodnotám. Nutno též předpokládat nižší citlivost bakterií přítomných v dýchacích cestách ve formě biofilmu ve srovnání s planktonickou formou téhož

kmene při vyšetření in vitro. Výsledky pro některé kmeny (zvláště č. 1232) zároveň ukazuje obecnou schopnost klonu CZ1 vyvíjet rezistenci ke všem testovaným antimikrobním látkám.

Tabulka 10. - Procentuální zastoupení izolátů CZ1 klonu rezistentních k vyšetřovaným antimikrobním látkám (%)															
Antimikrobní látka / metoda	Meropenem	Imipenem	Ceftazidim	Cefepim	Piperacilin	Piperacilin + tazobactam	Temocilin	Kotrimoxazol	Chloramfenikol	Ciprofloxacín	Tigecyklin	Doxycyklin	Tobramycin	Amikacin	Gentamicin
Disková difuzní metoda	50	75	25	100	25	25	-	100	100	100	83,4	100	100	100	100
Etest	75	-	25	-	58,3	-	41,7	58,3	91,7	100	83,4	100	100	100	-
Agarová diluční metoda	58,3	-	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

### Citlivost k dezinfekčním látkám

Výsledky vyšetření citlivosti k testovaným dezinfekčním látkám stanovené pomocí diluční metody v bujónu (MIK) a suspenzní metody (MBK) udávají tabulky 10 a 11. Procento rezistentních izolátů udává tabulka 13. Izoláty klonu *B. cenocepacia* CZ1 i referenční kmeny byly k dezinfekčním látkám relativně rezistentní a v případě chlornanu sodného, glutaraldehydu a jodonalu A naměřené hodnoty rezistence překročily doporučené expoziční koncentrace.

Tabulka 11. - Vyšetření účinnosti dezinfekčních látek I.								
Látka	Chlorhexidin		Benzalkonium bromid		Chloramin B		Chlornan sodný	
Obvyklá účinná koncentrace a čas	2000-10000 mg/l 30-60 sec		100000 mg/l 30 sec		10000 mg/l 30 min		500 - 5000 mg/l 30 min	
Hodnota	MIK	MBK	MIK	MBK	MIK	MBK	MIK	MBK
Jednotky	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l
X127	78,125	156,25	312,5	312,5	1250	2500	2500	5000
457	78,125	156,25	156,25	625	1250	1250	5000	5000
459	78,125	312,5	312,5	625	1250	2500	5000	5000
460	156,25	312,5	312,5	625	1250	2500	5000	5000
463	78,125	312,5	156,25	625	1250	1250	5000	5000
573	78,125	156,25	312,5	625	1250	2500	5000	5000
817	78,125	312,5	312,5	312,5	1250	1250	2500	5000
1232	78,125	156,25	312,5	625	1250	1250	5000	5000
5420	156,25	312,5	312,5	312,5	1250	1250	5000	5000
6064	78,125	156,25	156,25	625	1250	2500	5000	5000
6183	156,25	312,5	312,5	625	1250	2500	5000	5000
6184	156,25	312,5	156,25	1250	1250	5000	2500	2500
14294	78,125	156,25	156,25	312,5	1250	2500	5000	5000
16656	78,125	156,25	312,5	625	1250	2500	2500	5000
16660	156,25	312,5	156,25	625	1250	2500	2500	2500

Tabulka 12. - Vyšetření účinnosti dezinfekčních látek II.								
Látka	Glutaraldehyd		Kys. peroctová		Jodonal A		Isopropanol	
Obvyklá účinná koncentrace a čas	350-1400 mg/l 30-60 min		1800-32400 mg/l 15-30 min		5000-30000 mg/l 1-5 min		350 g/l 30 sec	
Hodnota	MIK	MBK	MIK	MBK	MIK	MBK	MIK	MBK
Jednotky	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	g/l	g/l
X127	2500	5000	312,5	1250	6250	12500	18,75	150
457	2500	5000	312,5	1250	6250	12500	37,5	150
459	2500	5000	625	2500	12500	12500	18,75	150
460	2500	5000	312,5	1250	12500	12500	18,75	150
463	2500	5000	1250	2500	12500	12500	18,75	150
573	2500	5000	1250	2500	12500	12500	18,75	75
817	2500	2500	312,5	1250	6250	12500	18,75	150
1232	2500	5000	312,5	625	12500	12500	18,75	150
5420	2500	5000	312,5	625	6250	6250	18,75	75
6064	2500	5000	312,5	1250	6250	6250	18,75	75
6183	2500	2500	312,5	625	12500	12500	37,5	150
6184	2500	5000	625	1250	6250	12500	18,75	150
14294	1250	2500	312,5	625	6250	6250	18,75	75
16656	2500	2500	625	1250	12500	12500	18,75	75
16660	1250	2500	312,5	1250	6250	6250	37,5	75

Tabulka 13. - Procentuální zastoupení izolátů CZ1 klonu rezistentních k vyšetřovaným dezinfekčním látkám (%)								
Dezinfekční látka	Chlorhexidin	Benzalkonium bromid	Chloramin B	Chlornan sodný	Glutaraldehyd	Kys. peroctová	Jodonal A	Isopropanol
Diluční metoda v bujónu (MIK)	0	0	0	75	100	0	100	0
Suspenní metoda (MBK)	0	0	0	91,7	100	25	100	0

Z výsledků lze usuzovat, že chlornan sodný, glutaraldehyd ani jodonal A za podmínek v praxi nedosahují koncentrace dostatečné k eliminaci bakterií klonu CZ1. I když účinek chlornanu a glutaraldehydu látek lze zvýšit zahřátím k jeho snížení může přispět přítomnost ochranného média (hlen či krev) nebo růst *Bcc* ve formě biofilmu (Sattar 2006; Smith & Hunter 2008). Jodonal A je vzhledem k obvyklým krátkým dezinfekčním časům látkou zcela nevhodnou. Perspektivními dezinfekčními látkami jsou oproti tomu chloramin B a kyselina peroctová, které měly *in vitro* baktericidní účinek i v nižších než doporučených

koncentracích. Vhodným pro dezinfekci kůže může být benzalkonium bromid a chlorhexidin, u kterých bylo pro klon CZ1 dosaženo výsledků srovnatelných s podobnými studii na *Bcc* (Rose et al. 2009). Isopropanol jako zástupce alkoholů účinkuje pouze ve vysokých koncentracích, nicméně nedosahujících ani poloviny doporučených expozičních koncentrací a lze u něj při zachování správného postupu předpokládat dostatečný účinek (Kac et al. 2009).

## **Závěr**

Výsledky práce ukazují, že populace klonu *B. cenocepacia* CZ1 v je rezistentní ke většině z klinicky použitelných antimikrobních látek. Tato rezistence je pravděpodobným důsledkem kombinace řady molekulových mechanismů a představuje závažný problém při léčbě infekcí vyvolaných klonem CZ1. Za potenciálně účinné lze považovat meropenem, ceftazidim, piperacilin a temocilin, jejichž klinickému použití však vždy musí předcházet kvantitativní vyšetření citlivosti infikujícího kmene. Práce rovněž prokázala dobrou citlivost klonu CZ1 k několika dezinfekčním látkám jako je chloramin B, kyselina peroctová, chlorhexidin a benzalkonium bromid, jejichž použití lze proto doporučit. V případě ostatních látek přesahovaly naměřené hodnoty MIK nebo MBK doporučené koncentrace a lze očekávat, že při jejich použití nebude dosaženo potřebného dezinfekčního účinku.

## Souhrn

Cystická fibróza (CF) je závažné dědičné onemocnění, způsobené mutací genu pro chloridový kanál CFTR, které vede k hromadění vazkého hlenu v plicích a dalších orgánech. Pacienti s CF jsou ohroženi zejména plicními infekcemi. K významným původcům těchto infekcí patří bakterie komplexu *Burkholderia cepacia* (*Bcc*), které jsou rezistentní k řadě antimikrobních a dezinfekčních látek a mohou se šířit mezi pacienty a léčebnými centry. Českou populaci nemocných s CF charakterizuje neobvykle vysoký výskyt infekcí *Bcc* způsobený rozšířením epidemického klonu *B. cenocepacia* CZ1. Protože infekce *Bcc* vedou u pacientů s CF k pozvolnému zhoršování plicních funkcí a mohou končit i fatálně, je potřeba jim adekvátně přecházet a efektivně je léčit.

Cílem experimentální části práce bylo definovat citlivost klonu CZ1 k antimikrobním a dezinfekčním látkám s cílem výběru potenciálně účinných látek vhodných k léčbě a prevenci infekce. Vyšetřeno bylo 11 izolátů klonu CZ1 od různých pacientů z let 1998-2009 a 4 referenční kmeny *Bcc*. Citlivost k antibakteriálním látkám byla vyšetřena diskovým difuzním testem, Etestem a diluční agarovou metodou. Citlivost k dezinfekčním látkám byla určena stanovením MIK diluční metodou v bujónu a MBK suspenzní metodou.

Výsledky ukázaly, že populace klonu *B. cenocepacia* CZ1 je vysoce rezistentní ke většině z testovaných antimikrobních látek a některým dezinfekčním látkám. Za potenciálně účinná antibiotika lze označit pouze meropenem, ceftazidim, piperacilin a temocilin, vůči nimž byla citlivá část izolátů. Práce rovněž prokázala dobrou citlivost klonu CZ1 k dezinfekčním látkám chloraminu B, kyselině peroctové, chlorhexidinu a benzalkonium bromidu. Léčebný a dezinfekční režim bude vhodné upravit zjištěným skutečným.



## Summary

Cystic fibrosis (CF) is a serious inherited disease caused by a mutation in the gene encoding a chloride ion channel (CFTR), which results in the accumulation of viscous mucus in lungs and other organs. Patients with CF are of particular risk of being affected with lung infections caused by different microorganisms. Bacteria of the *Burkholderia cepacia* complex (*Bcc*) are one the most important group of agents causing these infections. These bacteria are resistant to multiple antimicrobial agents and disinfectants and can spread between patients and specialized centres. The Czech population of CF patients is characterized by the high prevalence of the *Bcc* infections caused by the epidemic spread of a *B. cenocepacia* clone termed CZ1. Infections with *Bcc* usually result in a slow deterioration of lung functions in CF patients and can be fatal. Therefore, there is a need of adequate prevention measures and effective treatment.

In the experimental part of this study, the susceptibility of the CZ1 clone to antimicrobial agents and disinfectants was assessed with the aim to select potentially effective therapeutics and biocides to control *Bcc* infections. Eleven isolates of clone CZ1 obtained from different patients in 1998-2009 and four reference strains were studied. Susceptibility to antimicrobial agents was tested by disk diffusion, Etest and agar dilution. Susceptibility to disinfectants was determined by assessing of MIC by broth dilution and of MBC by suspension test.

The results have shown that the population of clone CZ1 is resistant to the majority of antimicrobial agents and some disinfectants. Yet, some antibiotics including meropenem, ceftazidime, piperacilline and temocilline retained activity against some of the isolates. In addition, the CZ1 isolates showed a good susceptibility to some disinfectants such as chloramine B, peracetic acid, chlorhexidine and benzalkonium bromide. These compounds can therefore be recommended for the control of *Bcc* infections in Czech CF patients.

## Použitá literatura

BOUCHER R.C., KNOWLES M.R., YANKASKAS J.R. **Chapter 38 - Cystic Fibrosis.** In: *Mason: Murray & Nadel's Textbook of Respiratory Medicine, 4<sup>th</sup> ed.* Philadelphia: Saunders 2005, p. 1217-1251.

CAPARRO C., MAURER J., GUTIERREZ C., KRAJDEN M., CHAN CH., WINTON T., KESHAVJEE S., SCAVUZZO M., TULLIS E., HUTCHEON M., KESTEN S. (2001): **Infection with *Burkholderia cepacia* in Cystic Fibrosis - Outcome Following Lung Transplantation.** *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, vol. 61, p.43-48.

CARAHER E., REYNOLDS P., MURPHY P., MCCLEAN S., CALLAGHAN M. (2007): **Comparison of antibiotic susceptibility of *Burkholderia cepacia* complex organism when grown planktonically or as biofilm in vitro.** *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 2006, vol. 26, p.213-216.

CFKLUB - KLUB NEMOCNÝCH CYSTICKOU FIBRÓZOU: **Standardy péče o nemocné CF** [online]. Dostupnost z [www:<http://www.cfklub.cz>](http://www.cfklub.cz)

CLODE F.E., KAUFMANN M.E., MALNICK H., PITT T.L. (2000): **Distribution of Genes Encoding Putative Transmissibility Factors among Epidemic and Nonepidemic Strains of *Burkholderia cepacia* from Cystic Fibrosis Patients in the United Kingdom.** *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 38, p. 1763-1766.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Fifteenth Informational Supplement M100-S15.** CLSI, Wayne, PA, USA, 2005.

COENYE T., GORIS J., SPILKER T., VANDAMME P., LIPUMA J.J. (2002): **Characterization of Unusual Bacteria Isolated from Respiratory Secretions of Cystic Fibrosis Patients and Description of *Inquilinus limosus* gen. nov., sp. nov.** *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 40, p. 2062-2069.

CREMIEUX A., FRENEY J., DAVIN-REGLI A. (2001): **Methods of Testing Dsinfektants.** In: Block S.S. (ed), *Disinfection, Sterilization, and Preservation*, 5th Edition, 1305-1328. Lippincot, Williams and Wilkins. Philadelphia, USA. 2001.

DALES L., FERRIS W. VANDEMHEEN K., AARON S.D. (2009): **Combination antibiotic susceptibility of biofilm-grown *Burkholderia cepacia* and *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients with pulmonary exacerbations of cystic fibrosis.** *European Journal of Clininical Microbiology and Infectious Diseases* 2009, (in print).

DAVIES JC, RUBIN BK. (2007): **Emerging and unusual gram-negative infections in cystic fibrosis.** *Semin Respir Crit Care Med*, vol.28, p.312-321.

DAVIES J.C., BILTON D. (2009): **Bugs, Biofilms, and Resistance in Cystic Fibrosis.** *Respiratory Care*, vol. 54, p. 628-640.

DŘEVÍNEK P., CINEK O., MELTER J., LANGSADL L., NAVESNAKOVA Y., VAVROVA V. (2003): **Genomovar distribution of the *Burkholderia cepacia* complex differs significantly between Czech and Slovak patients with cystic fibrosis.** *Journal of Medical Microbiology*, vol. 52, p. 603-604.

DŘEVÍNEK P. (2005): **Molekulárně genetická diagnostika bakterií komplexu *Burkholderia cepacia* u pacientů s cystickou fibrózou.** Disertační práce, Univerzita Karlova v Praze.

DŘEVÍNEK P., VOŠÁHLÍKOVÁ Š., CIENK O., VÁVROVÁ V., BARTOŠOVÁ J., POHŮNEK P, MAHENTHIRALINGAM E. (2005): **Widespread clone of *Burkholderia cenocepacia* in cystic fibrosis patients in the Czech Republic.** *Journal of Medical Microbiology*, vol. 54, p. 655–659.

FILA P. (2007): **ATB léčba infekce komplexem *Burkholderia cepacia*.** CF centrum Praha - vnitřní standard.

GIBSON R.L., BURNS J.L., RAMSEY B.W. (2003): **Pathophysiology and Management of Pulmonary Infections in Cystic Fibrosis.** *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, vol. 168, p.918-951.

GIDEON – Global Infectious Diseases & Epidemiology Network: *Burkholderia cepacia*. Dostupnost z [www:<http://www.gideon.org>](http://www.gideon.org)

GOVAN J.R.W. (2006): **Multidrug-resistant pulmonary infection in cystic fibrosis – what does ‘resistant’ mean?** *Journal of Medical Microbiology*, vol. 72, p. 1615–1617.

HUTCHISON M.L., GOVAN J.R.W. (1999): **Pathogenicity of microbes associated with cystic fibrosis.** *Microbes and Infection*, vol.1, p.1005–1014.

KAC G., MASMEJEAN E., GUENERET M., RODI A., PEYRARD S., PODGLAJEN I. (2009): **Bactericidal efficacy of a 1.5 min surgical hand-rubbing protocol under in-use conditions.** *Journal of Hospital Infection*, vol. 72, p.135-139.

MACKENZIE F.M., SMITH S.V., MILNE K.E., GRIFFITHS K., LEGGE J., GOULD I.M. (2004): **Antibiograms of resistant Gram-negative bacteria from Scottish CF patients.** *Journal of Cystic Fibrosis*, vol. 3, p. 151-157.

MAHENTHIRALINGAM E., BALDWIN A.,VANDAMME P. (2002): ***Burkholderia cepacia* complex infection in patients with cystic fibrosis.** *Journal of Medical Microbiology*, vol. 51, p. 533–538.

MAHENTHIRALINGAM E., BALDWIN A., DOWSON C.G. (2008): ***Burkholderia cepacia* complex bacteria: opportunistic pathogens with important natural biology.** *Journal of Applied Microbiology*, vol. 104, p. 1539–1551.

MCDOWELL A. (2004): **Epidemiology of *Burkholderia cepacia* komplex species recovered from cystic fibrosis patients: issues related to patient segregation.** *Journal of Medical Microbiology*, vol. 53, p. 663–668.

MELICHARČÍKOVÁ V. **Dezinfekce a sterilizace ve zdravotnictví.** Praha: Grada 1998.

MELICHARČÍKOVÁ V. **Sterilizace a dezinfekce v prevenci nozokomiálních nákaz.** Praha: Galén 2007.

MUSSAFFI H., RIVLIN J., SHALIT I., EPHROS M., BLAU H. (2005): **Nontuberculous mycobacteria in cystic fibrosis associated with allergic bronchopulmonary aspergillosis and steroid therapy.** *European Respiratory Journal*, vol. 25, p. 324–332.

- O'MALLEY C.A. (2009): **Infection Control in Cystic Fibrosis: Cohorting, Cross-Contamination, and the Respiratory Therapist.** *Respiratory Care*, vol. 54, p. 641- 653.
- PEETERS E., NELIS H.J., COENYE T. (2008): **Evaluation of the efficacy of disinfection procedures against *Burkholderia cenocepacia* biofilms.** *Journal of Hospital Infection* , vol.70, p. 361-368.
- RAZVI S., QUITTELL L., SEWALL A., QUINTON H., MARSHALL B., SAIMAN L. (2009): **Respiratory Microbiology of Patients With Cystic Fibrosis in the United States, 1995-2005.** *Chest*, [Epub ahead of print].
- ROSE H., BALDWIN A., DOWSON C.G., MAHENTHIRALINGAM E. (2009): **Biocide susceptibility of the *Burkholderia cepacia* complex.** *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 63, p. 502-510.
- SMITH K., HUNTER I.S. (2008): **Efficacy of common hospital biocides with biofilms of multi-drug resistant clinical isolates.** *Journal of Medical Microbiology*, vol. 57, p. 966-973.
- SATTAR S.A. (2006): **The use of microbiocides in infection control: a critical look at safety, testing and applications.** *Journal of Applied Microbiology*, vol. 101, p. 743-753.
- SPIPKER T., BALDWIN A., BUMFORD A., DOWSON C.G., MAHENTHIRALINGAM E., LIPULMA J.J. (2009): **Expanded multilocus typing for *Burkholderia* species.** *Journal of Clinical Microbiology*, published online ahead of print.
- VANLAERE E., LIPULMA 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.** *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol. 58, p.1580-1590.
- VAVŘINEC J. **Cystická fibróza.** In: HRODEK O., VAVŘINEC J. *Pediatric. Praha: Galén* 2002, p. 125-139.
- ZUCKERMAN J. B., ZUARO D.E., PRATO B.S., RUOFF K.L., SAWICKI R.W., QUINTON H.B., SAIMAN L. (2009): **Bacterial contamination of cystic fibrosis clinics.** *Journal of Cystic Fibrosis*, vol. 8, p.186-192.

## Seznam obrázků a tabulek

- Obrázek 1. – schéma CFTR a umístění mutace  $\Delta$  F508 na CFTR
- Obrázek 2. – Rozdíly ve tvorbě a funkci CFTR u zdravé buňky a buněk postižených CF
- Obrázek 3. – Mukociliární clearance
- Obrázek 4. – Závislost kolonizace jednotlivými druhy na věku pacienta
- Obrázek 5. – Mukoidní kolonie *Pseudomonas aeruginosa*
- Obrázek 6. – produkce pigmentů u izolátů *Bcc*
- Obrázek 7. – B. cenocepacia v čisté kultuře na krevním agaru
- Obrázek 8. – Dendrogram příbuznosti všech 17 druhů komplexu *B. cepacia* a tří dalších druhů rodu *Burkholderia* podle sekvence genu *recA*.
- Obrázek 9. – Infekce CZ1 klonem v populaci českých pacientů
- Obrázek 10. – Schéma účinku antimikrobních látek na *Bcc*
- Obrázek 11. – Schéma účinku dezinfekčních látek na *Bcc*
- Obrázek 12. - Příklady problémů při odečtu hranic inhibiční zóny v diskovém difuzním testu a Etestu

- Tabulka 1. - Nejčastější příznaky
- Tabulka 2. – Taxonomie komplexu *B. cepacia*
- Tabulka 3. – Pravděpodobné faktory patogenity komplexu *B. cepacia*
- Tabulka 4. – Vybrané fenotypové znaky komplexu *B. cepacia*
- Tabulka 5a. – Účinná antibiotika
- Tabulka 5b. – Terapeutické kombinace používané v současné době ve FN Motol
- Tabulka 5c. – Běžná empirická léčba dle závažnosti infekce
- Tabulka 6. – Vybrané dezinfekční látky
- Tabulka 7. – Studované bakteriální kmeny
- Tabulka 8. – Vyšetření citlivosti k antimikrobním látkám diskovou difuzní metodou
- Tabulka 9. – Vyšetření MIK vybraných antimikrobních látek Etestem a Agarovou diluční metodou
- Tabulka 10. – Procentuální zastoupení izolátů CZ1 klonu rezistentních k vyšetřovaným antimikrobním látkám
- Tabulka 11. – Vyšetření účinnosti dezinfekčních látek I.
- Tabulka 12. – Vyšetření účinnosti dezinfekčních látek II.
- Tabulka 13. – Procentuální zastoupení izolátů CZ1 klonu rezistentních k vyšetřovaným dezinfekčním látkám