

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

2. LÉKAŘSKÁ FAKULTA

Ústav lékařské mikrobiologie

Oldřiška Jandová

**Detekce faktorů virulence a genů rezistence
bakteriálních patogenů u pacientů
s cystickou fibrózou**

Bakalářská práce

Praha 2014

Autor práce: **Oldřiška Jandová**

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

Konzultant práce: **Mgr. Jan Tkadlec**

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

Datum obhajoby: **2014**

Bibliografický záznam

JANDOVÁ, Oldřiška. Detekce faktorů virulence a genů rezistence bakteriálních patogenů u pacientů s cystickou fibrózou. Praha: Univerzita Karlova, 2. lékařská fakulta, Ústav lékařské mikrobiologie, 2014. 52 s. Vedoucí bakalářské práce MVDr. Oto Melter, Ph.D.

Anotace

Cystická fibróza je autozomálně recesivní genetické onemocnění, které je způsobeno mutacemi v genu CFTR (*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*). Tento gen kóduje stejnojmenný protein, který pokud je narušena jeho funkce, je odpovědný za patogenezi tohoto onemocnění. Cystická fibróza je charakteristická častými respiračními infekcemi, které vedou k destrukci plicní tkáně. Tyto infekce se vyznačují přítomností typických bakteriálních patogenů např. *S. aureus*, *P. aeruginosa* a dalších.

Právě *S. aureus* patří mezi typické oportunní patogeny, které u pacientů s cystickou fibrózou způsobují vážné komplikace. Kmeny *S. aureus* se vyznačují produkcí mnoha faktorů patogenity a vlivem důrazné léčby antibiotiky také rezistencí k používaným antibiotikům. Jednou z možností, jak mohou bakterie snížit svou citlivost k určitému antibiotiku je tvorba fenotypových variant SCV, které se vyskytují u skupiny pacientů, kteří jsou intenzivně léčeni antibiotiky. Pacienti s cystickou fibrózou touto skupinou bezesporu jsou.

Cílem bakalářské práce bylo studium izolátů *S. aureus* od tří pacientů s cystickou fibrózou, kteří jsou dlouhodobě infikováni tímto patogenem. U těchto izolátů určit zda se mění jejich vlastnosti či rezistence v průběhu chronické infekce.

Klíčová slova

Cystická fibróza, *Staphylococcus aureus*, faktory virulence, geny rezistence, kmeny *S. aureus* SCV, MLSb.

Annotation

Cystic fibrosis is an autosomal recessive genetic disorder, which is caused by mutation in CFTR gene (*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*). This gene encodes protein with the same name, which is responsible for pathogenesis of CF. Cystic fibrosis is characteristic for frequent infection of respiratory system, which causes, destruction of lung tissue. These infections are characterized by occurrence of typical bacterial pathogens, for example: *S. aureus*, *P. aeruginosa* etc.

S. aureus is one of the most typical opportunistic pathogens, which causes serious difficulties in patients with the cystic fibrosis. Strains of *S. aureus* are characterized by production of multiple virulence factors and resistance to broad spectrum of antibiotics. Besides common mechanisms of resistance there is also possibility of emergence of so called Small Colony Variants in chronically infected patients. These resistant subpopulation is relatively common among *S. aureus* isolates of patients with CF.

The aim of this work was to study isolates from three patients with cystic fibrosis, who are chronically infected by *S. aureus*. Our goal was to determine changes in the pattern of the antibiotic resistance and occurrence of virulence factors together with description of SCV strains.

Keywords

Cystic fibrosis, *Staphylococcus aureus*, antibiotic resistance, virulence factors, Small Colony Variants, MLSb.

Prohlášení

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

V Praze **24. 4. 2014**

Jandová Oldřiška

Poděkování

Mé poděkování patří MVDr. Oto Melterovi Ph.D., za cenné rady a odborné vedení této práce. Dále bych chtěla poděkovat mému konzultantovi Mgr. Janu Tkadlecovi za praktické rady, trpělivost a ochotu, kterou mi v průběhu zpracování bakalářské práce věnoval. Také děkuji všem pracovníkům Ústavu lékařské mikrobiologie FN v Motole za jejich vstřícnost. A především mé rodině za jejich podporu v průběhu celého studia.

OBSAH

SEZNAM ZKRATEK.....	9
ÚVOD.....	10
<u>1 CYSTICKÁ FIBRÓZA</u>	<u>12</u>
1.1 HISTORIE	12
1.2 PŘÍČINA ONEMOCNĚNÍ.....	12
1.3 PROJEVY ONEMOCNĚNÍ.....	13
1.4 INFEKCE U PACIENTŮ S CF	14
1.4.1 HAEMOPHILUS INFLUENZAE	15
1.4.2 PSEUDOMONAS AERUGINOSA.....	16
1.4.3 BURKHOLDERIA CEPACIA	16
1.5 OSTATNÍ PATOGENY.....	17
1.6 LÉČBA	17
<u>2 STAPHYLOCOCCUS AUREUS.....</u>	<u>19</u>
2.1 VÝZNAM <i>S. AUREUS</i> PŘI CYSTICKÉ FIBRÓZE	20
2.2 FAKTORY VIRULENCE <i>S. AUREUS</i>	20
2.2.1 POVRCHOVÉ FAKTORY VIRULENCE.....	21
2.2.2 EXTRACELULÁRNÍ FAKTORY VIRULENCE	21
2.3 FAKTORY REZISTENCE <i>S. AUREUS</i>	23
2.3.1 MRSA	23
2.3.2 REZISTENCE K MLS_B ANTIBIOTIKŮM.....	24
2.3.3 SCV – SMALL COLONY VARIANT	25
<u>3 CÍL</u>	<u>26</u>
<u>4 MATERIÁL.....</u>	<u>27</u>
4.1 KULTIVAČNÍ PŮDY	27
4.2 ANTIBIOTIKA	27
4.3 LATEXOVÁ AGLUTINACE.....	27
4.4 IZOLACE DNA	27
4.5 MATERIÁL PRO PCR.....	28
4.5.1 KOMERČNÍ SADA PRO PCR	28
4.5.2 DNA STANDARDY.....	28
4.5.3 PRIMERY.....	28
4.6 ELEKTROFORÉZA	28
4.7 KONTROLNÍ KMENY.....	29
4.8 POUŽITÉ PŘÍSTROJE	29
<u>5 METODIKA</u>	<u>30</u>

5.1	ODBĚR SPUTA.....	30
5.2	KULTIVACE.....	30
5.3	STANOVENÍ CITLIVOSTI K ANTIBIOTIKŮM	30
5.3.1	DISKOVÝ DIFÚZNÍ TEST	31
5.4	MALDI – TOF/MS	31
5.5	LATEXOVÁ AGLUTINACE.....	32
5.6	TESTOVÁNÍ AUXOTROFIE	32
5.7	MOLEKULÁRNĚ BIOLOGICKÉ METODY.....	33
5.7.1	IZOLACE DNA	33
5.7.2	PCR	34
5.7.3	ELEKTROFORÉZA.....	35
5.8	SPA TYPIZACE	36
5.9	MUTACE V 23S RRNA	36
6	<u>VÝSLEDKY.....</u>	<u>38</u>
6.1	STANOVENÍ CITLIVOSTI K ANTIBIOTIKŮM	38
6.1.1	DDT-DISKOVÝ DIFÚZNÍ TEST	38
6.2	MALDI – TOF/MS	40
6.3	LATEXOVÁ AGLUTINACE.....	41
6.4	TESTOVÁNÍ AUXOTROFIE	41
6.5	GENY REZISTENCE	42
6.5.1	<i>ERMA</i>	42
6.5.2	<i>ERMB</i>	42
6.5.3	<i>ERMC</i>	42
6.5.4	<i>MSRA</i>	42
6.6	FAKTORY VIRULENCE	43
6.7	SPA TYPIZACE	45
6.8	MUTACE V 23S RRNA	46
	<u>DISKUZE.....</u>	<u>49</u>
	<u>ZÁVĚR.....</u>	<u>51</u>
	<u>REFERENČNÍ SEZNAM.....</u>	<u>52</u>

SEZNAM ZKRATEK

ATB	Antibiotika
Bcc	Burkholderia cepacia komplex
CF	Cystická fibróza
CFRT	Cystic fibrosis conductance transmembrane regulator
DDT	Diskový difúzní test
DIC	Diseminovaná intravaskulární koagulace
dNTP	Deoxyribonukleotidtrifosfát
dsDNA	Double stranded DNA
EDTA	Etylendiaminotetraoctová kyselina
MH	Mueller-Hinton agar
MIC	Minimální inhibiční koncentrace
MLS _B	Makrolidy-linkosamidy-streptograminy B
MRSA	Methicilin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
PBP	Penicilin-binding protein
PCR	Polymerázová řetězová reakce
PVL	Pantonův-Valentinův leucocidin
rRNA	Ribosomální RNA
SCV	Small colony variants
ssDNA	Single stranded DNA
TSST-1	Toxin syndromu toxického šoku

ÚVOD

Cystická fibróza je autozomálně recesivní genetické onemocnění. Příčinou tohoto onemocnění jsou mutace v genu *CFTR* (*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*). Tento gen kóduje stejnojmenný protein, který je odpovědný za patogenezí tohoto onemocnění. Protein CFTR má funkci chloridového kanálu, který řídí i jiné iontové kanály. V důsledku dysfunkce tohoto proteinu dochází k poruše transportu iontů chloridovým kanálem. Tato patologie se projevuje u mnoha orgánů. Nejvíce ovlivněny jsou plíce pacientů s cystickou fibrózou, hustý sekret znesnadňuje mukociliární clearance plic. V důsledku toho je plicní parenchym destruován častými infekcemi plic. Tyto infekce jsou také častou příčinou vysoké morbidity a mortality u pacientů s cystickou fibrózou, kteří umírají kolem 30. roku života většinou na respirační selhání. Respirační infekce pacientů s CF jsou typické přítomností charakteristických bakteriálních druhů. Mezi tyto druhy se řadí poměrně často se vyskytující *S. aureus*.

S. aureus je jedním z typických bakteriálních druhů, které jsou izolovány ze sputa pacientů s CF. *S. aureus* je považován za významného patogena u pacientů s cystickou fibrózou, jelikož jeho přítomnost je prokázána již v prvních izolátech u dětí trpících tímto onemocněním. Kvůli častým respiračním infekcím, které jsou i chronické, jsou pacienti léčeni jednorázově či profylakticky antibiotiky. Díky razantní léčbě antibiotiky se u infikujících bakterií zvyšuje pravděpodobnost vzniku rezistence bakterie k antibiotiku. Příkladem je právě *S. aureus*, který produkuje řadu faktorů virulence a se stoupajícími dávkami různých antibiotik dochází k selekci rezistentních kmenů *S. aureus*. Právě bakteriální infekce rezistentních kmenů *S. aureus* jsou pro pacienty s cystickou fibrózou velkou komplikací.

U chronických infekcí *S. aureus* je často přítomna subpopulace *S. aureus* SCV (Small Colony Variants). Vlivem intenzivní antibiotické léčby, kterou pacienti s cystickou fibrózou podstupují, se vytvářejí podmínky pro uplatnění SCV kmenů *S. aureus*. Tato subpopulace je od normálních mateřských kmenů *S. aureus* fenotypově odlišná. Projevují se pomalým růstem, ztrátou pigmentace a hemolýzy. U většiny kmenů SCV je vlivem mutace vytvořena auxotrofie a to k menadionu, heminu či thymidinu. U pacientů s cystickou fibrózou převažují thymidin-auxotrofní kmeny SCV. Fenotypové varianty SCV mají sníženou citlivost k určitým antibiotikům a tím představují pro léčbu stafylokokové infekce u pacientů s cystickou fibrózou velkou překážku.

Ve své práci se zabývám studiem vzorků izolovaných po dobu dvou let od 3 pacientů s CF. Různými metodami zjišťuji, zda dochází při chronických infekcích ke změně patogenních vlastností a rezistence kmene *S. aureus* k antibiotikům.

1 Cystická fibróza

1.1 Historie

Již ve středověku byly popsány první charakteristické příznaky cystické fibrózy. Podle lidových pověr byly děti trpící tímto onemocněním označovány začarovanými a nazývány „slané děti“ díky vysoké koncentraci soli v jejich potu. První případ byl popsán profesorem botaniky a anatomie Pieterem Pauwem (1564 – 1617) v roce 1595 u 11 leté pacientky, které měla těžké změny na pankreatu. V roce 1936 Guido Fanconi publikoval zprávu, ve které rozlišil změny u pacientů s CF a celiakií a poukázal také na změny v pankreatu a bronchioektázii. Zásadní krok přišel až díky doktorce Dorothy Andersenové v roce 1938, která přesně popsala toto onemocnění u velkého počtu pacientů a nazvala jej cystická fibróza pankreatu [1,2,3].

V České republice byl první případ cystické fibrózy, zaznamenán v roce 1946 na II. dětské klinice v Praze. V roce 1960 byla poprvé do klinické diagnostiky zavedena metoda měření chloridových iontů v potu, pomocí pilokarpinové iontoforézy. Pomocí nové metody pro detekci chloridů v potu přibývaly nové případy pacientů s CF i mezi staršími dětmi. Postupně se zaváděly nové metody v léčbě, vznikala nová specializovaná centra i dostupnost léků se zlepšovala, tím se výrazně prodlužoval věk pacientů. Dalším mezníkem v léčbě byla transplantace plic, která se zařadila do léčebných postupů v roce 1998 [1,3].

1.2 Příčina onemocnění

Cystická fibróza je autozomálně recesivní genetické onemocnění. V europoidní populaci se udává incidence 1 : 2500 novorozenců - z toho vyplývá, že frekvence přenašečů je 1 / 25. Příčina onemocnění je způsobena mutací v genu *CFTR*. Tento gen se nachází na chromozomu 7 a to na dlouhém raménku v oblasti 7q31.2, má rozsah 250 kb DNA a obsahuje 27 exonů. Produktem tohoto genu je protein, který nazýváme CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator – transmembránový regulátor vodivosti). Tento protein funguje jako regulovaný chloridový kanál, který se nachází na apikální membráně epitelálních buněk. CFTR protein je důležitý pro udržení optimální hustoty sekretů dýchacích cest a to pomocí vylučování chloridových iontů a zabránění

absorpce sodných iontů. U pacientů S CF je tento protein defektní, což vede k abnormalitám u řady orgánů, které fyziologicky produkují hlen. Patří mezi ně dýchací cesty, pankreas, střeva, žlučový systém a v neposlední řadě potní žlázy.

Je popsáno více než 1500 mutací, které jsou rozděleny do pěti tříd, podle mechanismu poškození CFTR proteinu. V případě mutace I. třídy jde o mutace, které mají za následek defekt v syntéze proteinu nebo v jeho struktuře. Mutace II. třídy vedou ke konformační změně proteinu a zabránění jeho transportu na apikální membránu buňky - příkladem je nejvíce zastoupená mutace, která se vyznačuje delecí kodonu pro fenylalanin v pozici 508 označovanou F508del, vyskytující se v 70 % případů CF. Zástupcem mutace III. třídy je mutace G551D, protein je přítomen na povrchu buňky, ale není zajištěn dostatečný transport chloridových iontů. Mutace IV. třídy má za následek zachování normálního množství proteinu, ale vodivost kanálu je snížena. A mutace V. třídy vedou ke snížení funkčnosti proteinu bez snížení jeho produkce.

Mutace F508del je nejčastější a nejvíce zastoupenou, pouze malá skupina jiných mutací se vyskytuje ve větším procentu než 0,5. Další mutace jsou velice vzácné. Jsou známy mutace všech typů, ale nejčastější jsou mutace, které mění smysl kodónu. Další skupinou jsou mutace bodové, jako poslední jsou genomové přestavby, které tvoří méně než 1 % [1,4].

1.3 Projevy onemocnění

Cystická fibróza je dědičné onemocnění, které je charakterizováno multiorgánovým postižením. Příčinou je mutace v genu *CFTR*, který kóduje protein nazývaný CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator). Tento patologický protein, který má funkci chloridového kanálu je umístěný na apikální membráně buněk. Díky tomu dochází ke špatnému přenosu elektrolytů tedy i sodných iontů. Spolu se sodnými ionty je transportována voda, což vede ke změně viskozity sekretu. Tento hustý sekret je přítomen v řadě orgánů jako jsou např. plíce, střeva, pankreas, potní žlázy, mužské genitálie a způsobuje patologické změny, které se projevují řadou komplikací, proto má CF charakter multiorgánového postižení [1,3,4,6].

Nefunkční protein CFTR, který se nachází ve vývodech potních žláz, způsobuje poruchu vstřebávání chloridových iontů, to způsobuje vysokou koncentraci těchto iontů v potu. Tato potní anomálie má pro stanovení diagnózy velký význam. Potní test se

pokládá v dnešní době za zlatý standard v diagnostice. Tento test spočívá ve stimulaci potních žláz pilokarpinovou iontoforézou a stanovení koncentrace chloridů v potu. Jsou i pacienti s cystickou fibrózou, kteří mají normální hladinu chloridů v potu, proto jsou diagnostikováni pomocí jiných metod, tyto případy se však nevyskytují často. Hraniční hodnoty pro vyšetření chloridů v potu se pohybují mezi 30 – 60 mmol/l. Referenční hodnoty jsou nastaveny do 30 mmol/l. Většina pacientů s CF se pohybuje v hodnotách kolem 80 – 120 mmol/l [1,4,6,8].

Na sliznicích dýchacích cest se kvůli poruše transportu iontů vytváří hustý sekret, který ovlivňuje mukociliární clearance. Důsledkem je narušení čistících a obranných mechanismů dýchacího traktu a vytvoření ideálních podmínek, které patogen pro osídlení a rozvoj infekce potřebuje. Následné infekce vedou k zánětům, které vyvolávají destrukci plicní tkáně. Tato poškození jsou hlavní příčinou úmrtí pacientů, kteří nejčastěji umírají na respirační selhání [1,4].

Cystická fibróza se ve velké míře projevuje v dětském věku. V 10 – 20% případů ji v novorozeneckém věku manifestuje mekoniový ileus. Díky poruchám trávení, pacienti neprospívají, často zvrací, trpí plynatostí a mají objemné stolice, které zapáchají. Hlavní příčinou jsou změny na pankreatu. Mezi další poruchy pankreatu u pacientů s CF řadíme pankreatitidu a diabetes melitus. Kvůli vazkému hlenu dochází ve střevě k distálnímu obstrukčnímu syndromu, dále se objevuje invaginace a apendicitida. V žlučníku dochází k tvorbě žlučových kamenů, objevují se koliky a cholelitiázy. U pacientů se projevuje i jaterní onemocnění v podobě cirhózy, může být přítomný i ikterus a hepatomegalie [1,4,5,6].

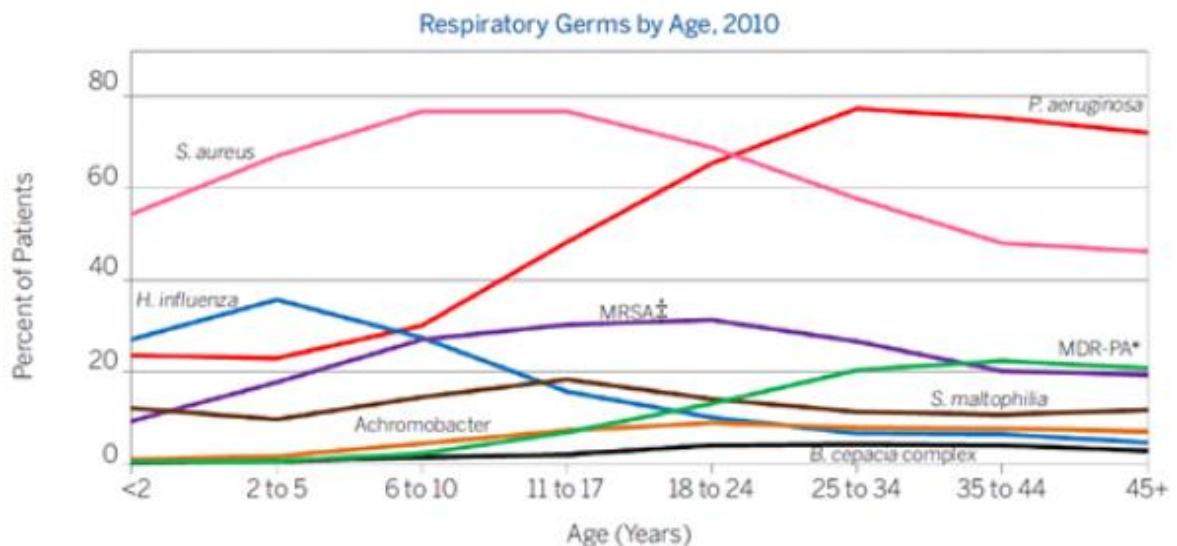
U pacientek se objevuje nepravidelný menstruační cyklus a u většiny je přítomna amenorea. Jsou u nich diagnostikovány časté ovariální cysty - i proto mají pacientky sníženou schopnost otěhotnět. Muži jsou ve většině případů neplodní. Důvodem infertility je nepřítomnost vas deferens [1,4].

1.4 Infekce u pacientů s CF

Hlavním faktorem, který určuje morbiditu a mortalitu u pacientů s cystickou fibrózou, jsou progresivní infekce dýchacích cest. Tyto infekce vedou k poškození plicního parenchymu a následné respirační selhání je jednou z hlavních příčin úmrtí pacientů s cystickou fibrózou. Cystická fibróza je způsobena defektem proteinu CFTR, který způsobuje změnu ve viskozitě hlenu. Díky tomuto dysfunkčnímu proteinu dochází

k zhoršení funkce očištění dýchacích cest a tím k vytvoření příznivých podmínek pro osídlení bakteriálních patogenů. Respirační infekce jsou charakteristické přítomností typických bakteriálních druhů např.: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae* a nejobávanější *Burkholderia cepacia* [1,4].

V dětském věku dominuje přítomnost *S. aureus* a *H. influenzae*. Naopak v dospělém věku jsou pacienti kolonizováni *P. aeruginosa* a *B. cepacia*, které mohou způsobit chronické infekce a tím se výrazně uplatnit ve zhoršení prognózy onemocnění. K méně zastoupeným patogenům, které nacházíme u pacientů, patří *Stenotrophomonas maltophilia*, *Burkholderia gladioli*, *Achromobacter xylosoxidans* a další. Ty převládají až v pozdějším věku a jsou spojeny s těžkým poškozením plic. V dalších kapitolách budou podrobně popsány jednotlivé patogeny včetně *S. aureus*, kterému je vyhrazena samostatná kapitola [1,3,11].



Obrázek č. 1: Graf znázorňuje zastoupení bakteriálních patogenů u pacientů s cystickou fibrózou v závislosti na věku pacientů, kdy převažující *S. aureus* je se stoupajícím věkem nahrazován *P. aeruginosa*. Obrázek je převzat z Annual Report of Cystic Fibrosis Foundation 2010.

1.4.1 *Haemophilus influenzae*

H. influenzae je gramnegativní tyčka, která se vyskytuje v normální mikroflóře horních dýchacích cest. U některých kmenů nalézáme pouzdro. Podle tohoto polysacharidového pouzdra se dělí do 6 - ti antigenních skupin, které označujeme a – f. Nejvýznamnější je typ b, který způsobuje prudké infekce např. meningitidy, laryngotracheitidy či otitidy. Proti tomuto patogenu existuje účinné očkování. Na kmeny, které pouzdro nemají, je toto očkování neúčinné. Kmeny bez pouzdra způsobují

u pacientů s CF respirační infekce, kdy postupně dochází k narušení již dysfunkčního mechanismu eliminace bakterií pomocí řasinek. *Haemophilus influenzae* osídluje dolní cesty dýchací a způsobuje hnisavé infekce, které dále poškozují plicní parenchym [1,9,10].

1.4.2 *Pseudomonas aeruginosa*

Jde o aerobní gramnegativní pohyblivé tyče. Vyskytuje se v odpadních vodách a v půdě. Velký význam pro šíření infekce má její vlastnost přežívání a množení ve vlhkých prostředích. Jedná se o typického oportunního patogena. Pro zdravého člověka nepředstavuje významnou hrozbu, naopak u osob se sníženou imunitou může být příčinou závažných infekcí. Do této široké skupiny osob patří včetně pacientů s cystickou fibrózou také pacienti s diabetes mellitus, popáleninami, uživatelé antibiotik, jedinci s autoimunitními onemocněními a pacienti po transplantaci, kteří užívají imunosupresiva. Nachází se v nemocničních prostorách a to zejména na jednotkách intenzivní péče, resuscitačních a novorozeneckých odděleních. Kontaminuje ventilátory, katetry a způsobuje infekce sliznic respiračního traktu a močových cest. Kmeny, které jsou izolovány v nemocničním prostředí, jsou obvykle vysoce rezistentní vůči antibiotikům.

Je velmi důležité, aby infekce u pacientů s CF byla odhalena co nejdříve. Jelikož primoinfekce jsou více citlivé k antibiotikům a tím je léčba úspěšnější. I přes razantní a soustavnou léčbu antibiotiky, může tato infekce přejít do chronické podoby. Typické kmeny, které kolonizují pacienty, se mění na mukózní formu. Tyto mukózně rostoucí bakterie vytváří biofilm, který ochraňuje bakterii před vlivem antibiotik a imunitního systému. Exacerbace infekce má za následek zhoršení funkce plic a také zvyšují morbiditu a mortalitu tohoto onemocnění [1,6,9,10,12].

1.4.3 *Burkholderia cepacia*

Jedná se o gramnegativní aerobní pohyblivou tyčku, která byla v roce 1950 popsána Walterem Burkholderem a původně nazvána *Pseudomonas cepacia*. Byla uvedena jako příčina hniloby cibule, díky které má své druhové jméno. V roce 1992 byl vytvořen samostatný rod *Burkholderia* do kterého bylo zařazeno spolu s *P. cepacia* dalších šest druhů, mezi nimiž byly *Pseudomonas gladioli*, *Pseudomonas mallei*, *Pseudomonas pickettii* a další. Vyskytuje se v půdě, vodách, řekách, byla identifikována na zelenině, v inhalátorech i v dezinfekčních roztocích. Od roku 1984, kdy byl

publikován podrobný popis klinického významu *B. cepacia* u pacientů s CF se řadí mezi nejzávažnější a nejobávanější patogeny u těchto pacientů. Její přítomnost výrazně ovlivňuje věk dožití pacienta.

Použití molekulárně biologických metod v taxonomii bakterií vedlo k tomu, že byl rozdělen původní druh *B. cepacia* do několika skupin, tzv. genomovarů. Soubor těchto genomovarů se nazývá komplex *B. cepacia* (Bcc). *Burkholderia cepacia* se vztahuje výhradně k genomovaru I. V České republice dominuje výskyt *B. cenocepacia*, tedy genomovar III., který způsobuje těžké infekce a výrazně zhoršuje zdravotní stav pacienta. Infekci může přenášet zdravotnický personál nebo se může přenášet z pacienta na pacienta. Příkladem mohou být i tábory pro děti s CF, díky kterým se Bcc epidemicky šířila. Je proto naprosto nezbytné izolovat pacienty s touto infekcí od ostatních pacientů. Komplex *B. cepacia* vykazuje abnormální rezistenci vůči mnoha antibiotikům. Je dokonce primárně rezistentní k velké škále antibiotik a i dříve prokázaná citlivost k určitým látkám, které se používají k léčbě, se může po určité době k těmto preparátům stát rezistentní. Průkaz Bcc u pacienta s CF je kontraindikací k transplantaci plic [1,6,12,13,].

1.5 Ostatní patogeny

U jedinců, kteří trpí CF, se objevují i méně známé patogeny. Nacházíme je u pacientů v pozdějším věku. Patří mezi ně *Stenotrophomonas maltophilia* - jedná se o pohyblivé tyčky, které jsou zodpovědné za vznik vážných nozokomiálních infekcí u oslabených jedinců. Tyto infekce mají vysokou mortalitu. Příčinou bývá fakt, že *S. maltophilia* je vysoce rezistentní k většině podávaným lékům jako např. k aminoglykosidům, penicilinům, cefalosporinům. Hlavní hrozbou tohoto patogenu, je schopnost přenosu infekce z pacienta na pacienta a tím ohrožení větší skupiny pacientů s CF, kterým rychlé šíření infekce způsobí další nežádoucí komplikace [1,12].

Dalším příkladem je *Achromobacter xylosoxidans*. Je to gramnegativní bakterie, která jen zřídka způsobuje vážné infekce. Tato bakterie je známa především svou vlastností rezistence k určitým typům antibiotik, ačkoli se nepředpokládá, že by výrazně zhoršovala primární onemocnění pacientů s CF [1,12].

1.6 Léčba

Cystická fibróza je závažné multiorganové onemocnění, které výrazně zkracuje délku života pacientů. Cystická fibróza je známá již více než 70 let, neexistuje však

dosud kauzální léčba. O kauzální léčbě můžeme hovořit pouze v případě mutace G551D. V současnosti existuje lék ivacaftor. Působí na protein CFTR, který se nachází na povrchu buněk, ale dostatečně nezajišťuje transport chloridových iontů. Ivacaftor zvyšuje propustnost chloridového kanálu, který ionty transportuje. Na nejčastější mutaci F508del však neúčinkuje. Proto jsou léčebné postupy zaměřeny na léčbu základních projevů tohoto onemocnění. Cílem léčby je prevence a potlačení infekce, sledování stavu výživy a zajištění dostatečné kvality života pacienta. V největší míře je terapie zaměřena na léčbu dýchacího ústrojí, jelikož poškození dýchacího systému je nejčastější příčinou úmrtí pacientů. Důležitou součástí léčby je také prevence, kdy se pacienti separují podle typu infekce, aby nedocházelo k šíření infekce mezi nimi. Zároveň je také kladen větší důraz na hygienu. Všichni pacienti s CF jsou pravidelně očkováni a to i proti chřipce. Pro diagnostiku infekcí respiračního traktu u pacientů s CF je významné vyšetření sputa nebo aspirátu sekretu dýchacích cest. Tato vyšetření se provádí pravidelně, aby došlo k včasné identifikaci infekce a tím se také vyhlídky na úspěšné залечení zvýšily. Léčba je dlouhodobá a intenzivní, antibiotika se podávají ve větších dávkách. S léčbou dýchacích cest je také spojena rehabilitace, která je zaměřena na odstranění přebytečného hlenu pomocí speciálních cviků. Pro usnadnění se používá inhalační lék rekombinantní lidská DNáza, která snižuje viskozitu sputa.

V neposlední řadě se také monitoruje stav výživy. Pankreatická insuficience je léčena substitucí pankreatických enzymů, což je pro zlepšení stavu nezbytné. Pacienti, tak mohou přijímat potraviny, které jsou svým obsahem bohaté na tuky. Důležité je také podávání vitamínů, které jsou rozpustné v tucích. Pro zajištění dostatečného příjmu energie, je nutné u většiny nemocných podávat nutriční výživu [1, 13,14,15].

2 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus je grampozitivní nepohyblivý, kataláza-pozitivní kok, který dosahuje v průměru 1 μm . V materiálu, který je pozitivní přítomností *S. aureus* pozorujeme v mikroskopu po obarvení podle Grama výskyt koků, které se v preparátu nacházejí buď jednotlivě, ve dvojicích nebo v nepravidelných shlucích připomínajících tvar hroznů. Na krevním agaru mají kolonie typickou žlutou až oranžovou barvu. Mohou se vyskytovat také v šedých až smetanově bílých variantách. Zbarvení je dáno karotenovými pigmenty. Charakteristicky je kolem většiny z nich vytvořena různě velká zóna hemolýzy.

S. aureus je významný lidský i zvířecí patogen. Kolonizuje sliznice a to především sliznice horních cest dýchacích a kůže. Asi 40 % populace jsou nosiči *S. aureus*, jeho přítomnost však pro ně není nijak patogenní. Tito jedinci však představují problém pro osoby s oslabenou imunitou a to včetně pacientů s cystickou fibrózou. Dalším nebezpečím pro pacienty s cystickou fibrózou představuje nemocniční prostředí. Zde se pacienti s CF mohou infikovat i velice obávanými kmeny, které jsou vysoce rezistentní např. MRSA (methicilin rezistentní *Staphylococcus aureus*).

S. aureus nejčastěji vstupuje do organismu přes horní cesty dýchací a přes poškozenou kůži. Důležitým faktorem pro rozvoj infekce je oslabený organismus. Tyto faktory mohou být jakékoli např. popáleniny, úrazy, diabetes mellitus, stavy po chirurgickém zákroku, malignity, imunodeficit. Predisponující pro vznik infekce je také přítomnost cizího tělesa, způsobujícího poranění nebo také v případě, kdy jde o katetry, stehy, umělé chlopně, endoprotézy. K těmto umělým povrchům *S. aureus* velmi dobře adheruje a množí se. Pro stafylokokové infekce je charakteristická tvorba abscesů. Z takto vytvořených ložisek se mohou uvolňovat bakterie, které se vyplavují do krevního řečiště. Bakteriémie, což je přítomnost bakterií v krvi může vést až k sepsi. Sepse se typicky projevuje horečkou, tachykardií, multiorgánovým poškozením, DIC (diseminovaná intravaskulární koagulace) a většinou končí úmrtím pacienta. *S. aureus* může být transportován krví do kteréhokoli orgánu a vytvářet tzv. metastatické infekce, což způsobuje řadu onemocnění jako například: endokarditidu, meningitidu, pyelonefritidu, artritidu, pneumonii, bronchopneumonii a další. K lokálním infekcím patří hnisavá onemocnění kůže a adnex, do kterých spadá impetigo, furunkl, folikulitida a další. *S. aureus* je také odpovědný za syndrom toxického šoku, který je

charakterizován zvýšenou teplotou, nauzeou, zvracením, poruchami funkce ledvin a jater. Tento stav, pokud není dostatečně léčen, může končit i smrtí. Za rozvoj tohoto onemocnění je zodpovědný toxin TSST – 1. Syndrom toxického šoku je spojován ve většině případů s používáním tampónů v období menstruace. Dalším příkladem stafylokokového onemocnění vyvolávaného toxinem je otrava z potravin. Dochází ke kontaminaci určité potraviny a k nahromadění toxinů, které po požití vyvolávají u jedince velké komplikace. Otrava je charakterizována zvracením, průjmy a křečemi. Tyto příznaky odezní většinou do několika dnů i bez léčby [1,11,16,17,20].

2.1 Význam *S. aureus* při cystické fibróze

S. aureus je poměrně častý patogen izolovaný ze sputa pacientů s cystickou fibrózou. Jeho důležitost podtrhuje fakt, že je jedním z prvních patogenů, který je přítomen u pacientů s CF již v dětském věku. V současnosti je přítomnost *S. aureus* detekována až u 70 % dětských pacientů s CF. Jeho prevalence se navíc v poslední dekádě podstatně zvýšila. Jakým způsobem se podílí na progresi plicního onemocnění, je doposud předmětem zkoumání. Samotná infekce *S. aureus* není spojena s výrazným zkrácením života pacientů, na rozdíl od infekce spojené s *P. aeruginosa*, kdy tato infekce může zkrátit život pacientů až o deset let. Jiné studie uvádějí, že přítomnost *S. aureus* aktivuje zánětlivou kaskádu, což vede k poškození plicní tkáně. Toto poškození je pak predisponujícím faktorem pro osídlení jinými patogeny například právě *P. aeruginosa*. Naopak některé studie uvádějí, že přítomnost *S. aureus* v dýchacích cestách je neutrálním prognostickým indikátorem a jeho přítomnost, může být i ochranná. Navarro a jeho kolegové, nedetekovali souvislost mezi přítomností *S. aureus* a zhoršením funkce plic. Další studie uvádí, že infekce vyvolaná samotným *S. aureus* je spojena s mírnějším stavem onemocnění a je spojena s delším přežitím pacientů s cystickou fibrózou. Obdobně, Liou a jeho spolupracovníci zjistili, že přítomnost infekce vyvolané *S. aureus* je považována za marker dlouhodobého přežití pacientů a jeho přítomnost může mít protektivní účinek před infekcemi mnohem závažnějších patogenů jako je například *P. aeruginosa* [1,21].

2.2 Faktory virulence *S. aureus*

Pojem virulence vyjadřuje schopnost určitého patogenu produkovat faktory, které usnadňují proniknutí přes obranné mechanismy hostitele a tím způsobit infekci.

Tato schopnost je u *S. aureus* podmíněna produkcí faktorů, které se rozdělují na povrchové a extracelulární [8,11].

2.2.1 Povrchové faktory virulence

PEPTIDOGLYKAN = Má podobnou funkci jako endotoxin, je zodpovědný za uvolňování cytokinů z makrofágů, aktivuje komplement a shlukuje erytrocyty [11].

POUZDRO = Pouzdro je složeno z polysacharidu. Vytvořením pouzdra se kmeny *S. aureus* stávají vysoce virulentní, vytvářejí mukoidní kolonie a tím odolávají fagocytóze i účinkům komplementu. Většina kmenů *S. aureus* má vytvořené pouzdro. Tyto kmeny se dělí do několika antigenních typů. K nejčastěji izolovaným kmenům *S. aureus* u člověka patří typy 5 a 8 [22, 23].

PROTEIN A = Jedná se o povrchový antigen, který je součástí peptidoglykanu buněčné stěny. Tento protein zabraňuje navázání komplementu a zabraňuje fagocytóze [11,23]

ADHEZNÍ MOLEKULY = Adhezní molekuly umístěné na povrchu buňky spadají do rodiny MSCRAMMs (*microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules*) a uplatňují se při adhezi *S. aureus* k hostitelské buňce. Dochází ke kolonizaci a následnému rozvoji infekce. Do této skupiny patří clumping factor, fibronectin-vázací protein, protein A, kolagen-vázací protein [24].

KYSELINA TEICHOOVÁ = Zprostředkovává adhezi na sliznice, rány i na umělé povrchy [22].

2.2.2 Extracelulární faktory virulence

KOAGULASA = Podílí se na změně fibrinogenu na fibrin, kdy při reakci s plazmatickým proteinem protrombinem vytváří stafylofibrin, který je zodpovědný za tuto přeměnu. Tímto se vytváří kolem stafylokoků ochranný obal tvořený fibrinem, jenž je chrání před fagocytózou. Vytvoření fibrinu přispívá také k tomu, že stafylokokové infekce se typicky projevují tvorbou abscesů.

HYALURONIDASA = Součástí mezibuněčné hmoty tkání je kyselina hyaluronová, kterou hyaluronidasa štěpí a tím pomáhá šířit stafylokokovou infekci.

HEMOLYZINY = Alfa-hemolyzin je produkován většinou kmenů *S. aureus*. Tento toxin způsobuje na krevním agaru lýzu ovčích a králíčích erytrocytů. Způsobuje úplnou beta-hemolýzu. Je známo, že hraje významnou roli v patogenezi stafylokokových onemocnění. Je produkován ve formě monomeru, který se navazuje na specifické receptory na povrchu buňky. Dochází k procesu interkalace do membrány buňky a vytvoření heptamerního póru. Výsledkem je narušení osmotické rovnováhy a integrity buňky, díky tomuto procesu nakonec dochází ke smrti cílové buňky [11,24,25].

Beta-hemolyzin neboli sfingomyelinasa C hydrolyzuje sfingomyelin v membránách hostitelských erytrocytů na fosforylcholin a ceramid. V důsledku tohoto procesu je změněna integrita i barva erytrocytů, ale nedochází k jejich destrukci. Až v důsledku tzv. hot-cold hemolysis dochází k jejich lýze, kdy v prvním kroku je narušena integrita buňky a to z příčiny hydrolyzy sfingomyelinu. V druhém kroku dojde k úplné hemolýze vlivem snížené teploty. Největší účinek má na ovčí a hovězí erytrocyty, zatímco u králíčích je tomu právě naopak. Potlačuje hemolýzu, kterou způsobuje alfa-hemolyzin [11,24,25].

Gama-hemolyzin se skládá ze dvou složek F a S. Je prokázán prakticky u všech kmenů *S. aureus*. Jeho účinky se nedají prokázat na krevním agaru, protože agar jeho vlastnosti inhibuje. U pacientů se stafylokokovou osteomyelitidou vyvolává protilátkovou odpověď [11,25].

Delta-hemolyzin na krevním agaru způsobuje lýzu ovčích erytrocytů. Ze všech hemolyzinů nejvýrazněji působí na lidské erytrocyty. Hemolýza je na krevním agaru přítomna jen nepatrně nebo vůbec a to v důsledku inhibice jeho účinku sérovými lipoproteiny [11].

PANTONŮV-VALENTINŮV LEUCOCIDIN = stejně jako gama-hemolyzin se skládá ze dvou složek S a F. Zatímco je gama-hemolyzin přítomen u většiny kmenů PVL je přítomen u 2 až 3 % kmenů *S. aureus*. Vytváří beta-póry v membráně neutrofilů a makrofágů, což vede k porušení integrity membrány buňky a k narušení iontové výměny, tím dochází k lýze buněk. Způsobuje i destrukci králíčích neutrofilů. Svým účinkem se podobá alfa-hemolyzinu. Tvorba pórů vyžaduje přítomnost dvou složek toxinu, Luks-PV a Lukf-PV. PVL hraje důležitou roli v ochraně stafylokoků před

fagocytózou. Je spojován s vážnými infekcemi kůže a je zodpovědný za nekrotizující pneumonie, které mají vysokou úmrtnost [24,25].

ENTEROTOXINY = Asi polovina kmenů *S. aureus* produkuje enterotoxiny. Jde o vysoce odolné termostabilní molekuly, které odolávají i půlhodinovému varu. Mají schopnost odolat i účinkům trávicích enzymů. Jsou zodpovědné za zvracení a průjem [11].

TOXIN SYNDROMU TOXICKÉHO ŠOKU - TSST-1 = Stejně jako enterotoxiny je TSST - 1 superantigenem. TSST-1 je spojován se vznikem syndromu toxického šoku. Klinicky se tento syndrom manifestuje hypotenzí, hypoalbuminemií, vyrážkou, průjemem, renální a jaterní dysfunkcí, trombocytopenií, hypofosfatemií, a hypokalcemií. Velmi častý a potencionálně život ohrožující je rozvoj syndromu akutní respirační tísně a DIC (diseminovaná intravaskulární koagulace). Syndrom toxického šoku je ve velké míře spojován s používáním menstruačních tampónů [25].

EXFOLIANTINY = V současné době jsou známy čtyři typy exfoliantů. K nejčastějším patří ET-A a ET-B. Ty mohou být příčinou vzniku stafylokokového syndromu opažené kůže (SSSS – *staphylococcal scalded skin syndrome*). V tomto případě dochází působením toxinů k vytvoření bul a následnému odlupování kůže. V případě méně progresivní infekce se objevují puchýře [11].

2.3 Faktory rezistence *S. aureus*

2.3.1 MRSA

V léčbě stafylokokových infekcí byl prvním používaným antibiotikem penicilin. V současnosti je přibližně 90 % kmenů *S. aureus* k penicilinu rezistentních, a to díky schopnosti tvořit beta-laktamázu, která specificky štěpí molekulu penicilinu a tím inhibuje účinek penicilinu. Rezistence je podmíněna přítomností plasmidu, který kóduje beta-laktamázu. Z tohoto důvodu byla vytvořena nová skupina antibiotik, která je odolná vůči účinkům beta-laktamázy. Do této skupiny patří oxacilin, cloxacilin a především v zahraničí používaný methicilin. Methicilin byl představen v roce 1959 a byl určen k léčbě infekcí způsobených penicilin-rezistentními kmeny *S. aureus*. Již v roce 1961, byl zaznamenán první případ rezistence na toto antibiotikum a tyto kmeny

byly označeny jako MRSA (methicilin-resistant *Staphylococcus aureus*). Kmeny MRSA se vyskytují převážně v nemocnicích.

Rezistence k methicilinu je podmíněna přítomností genu *mecA*, který je součástí stafylokokové chromozomové kazety SCCmec. *mecA* kóduje penicilin-vázající protein PBP2a. PBP (*penicilin – binding protein*) proteiny se podílejí na stavbě buněčné stěny a jejich funkci methicilin inhibuje. Změněný protein PBP2a ztrácí schopnost vázat methicilin.

Mnohé izolované kmeny MRSA jsou vysoce rezistentní a reagují pouze na glykopeptidová antibiotika. Do této skupiny antibiotik řadíme vankomycin, teikoplanin. V září roku 2002 byly izolovány kmeny MRSA rezistentní k vankomycinu, které jsou označovány VRSA (vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*). Tato rezistence je podmíněna genem *vanA*, pocházejícího s největší pravděpodobností od enterokoků [11,18,19].

2.3.2 Rezistence k MLS_B antibiotikům

Z důvodu rozšiřující se rezistence k beta-laktámovým antibiotikům a také v případě alergie na penicilin jsou používány MLS_B (makrolidy, linkosamidy, streptogramin B) antibiotika. Skupina MLS_B antibiotik zahrnuje makrolidová, linkosamidová antibiotika a streptogramin B, které spojuje mechanismus a cíl působení. Ve struktuře makrolidů je charakteristická přítomnost laktonového kruhu, ke kterému jsou pomocí glykosidické vazby připojeny neutrální sacharidy nebo/a aminosacharidy. Makrolidy se rozdělují podle počtu atomů, které tvoří laktonový kruh. K čtrnáctičetným patří jako vůbec první objevené makrolidové antibiotikum erytromycin a dále klaritromycin. Patnáctičetný je například azitromycin a šestnáctičetné jsou josamycin, spiramycin či tylosin. Zástupcem linkosamidů je přírodní linkomycin, který je produkován *Streptomyces lincolnensis*. Nahrazením atomu vodíku za chlor vzniká clindamycin, který je svým účinkem podobný linkomycinu. Zástupci streptograminů jsou quinupristin a dalfopristin.

I když jsou MLS_B antibiotika značně rozdílná ve své struktuře, jejich společným rysem je, že působí na stejné cílové místo v bakteriální buňce. Spojuje je i stejný mechanismus účinku, inhibicí funkce bakteriálního ribozomu blokuje proteosyntézu. Bakteriální ribozom se skládá z malé a velké podjednotky. Cílové místo těchto antibiotik představuje velká podjednotka a to především její hlavní část 23S rRNA,

kteřá zodpovídá za průběh translace. Navázání antibiotika na specifické místo ribozomu způsobí, že proteosyntéza je zastavena a tím ustává i růst bakteriální buňky.

Je několik příčin, které mohou podmiňovat rezistenci k těmto antibiotikům. Jednou z nejčastějších příčin rezistence jsou geny *erm*, které produkují metylázy. Způsobují metylaci adeninu a v důsledku toho dochází k změně cílového místa MLS_B antibiotik na 23S rRNA na ribozomu. MLS_B antibiotika se tedy nemohou navázat na příslušné cílové místo v ribozomu. Pro stafylokoky je charakteristická přítomnost genů *ermA*, *ermC* a *ermB*.

Dalším poměrně častým mechanismem rezistence k těmto antibiotikům je eflux, který je řízen geny *mefA* nebo *msrA*. Jedná se o přenos antibiotik pomocí efluxní pumpy zpět do extracelulárního prostoru, než dojde ke kontaktu s cílovým místem na ribozomu [28,29].

2.3.3 SCV – small colony variant

Perzistující infekce *S. aureus* jsou velmi často spojeny s přítomností subpopulace *S. aureus* tzv. SCV (small colony variants) kmeny. Tyto fenotypové varianty se objevují zejména u pacientů, kteří jsou dlouhodobě léčeni aminoglykosidovými antibiotiky nebo kotrimoxazolem. Kolonie typické pro běžné kmeny *S. aureus* jsou hladké, lesklé, dosahující v průměru 1 až 3 mm s pigmentací a přítomností hemolýzy. Pro SCV fenotyp je naopak charakteristický růst ve velmi drobných koloniích nebo koloniích vzhledem připomínajících volské oko („fried-eggs“), bez přítomnosti hemolýzy a pigmentace. Díky snížené expresi alfa-hemolyzinu je mohou kmeny *S. aureus* přežívat intracelulárně v hostitelské buňce. To má za následek sníženou citlivost vůči účinkům antibiotik. Specifický fenotyp kmenů SCV podmiňují mutace genů kódujících enzymy pro syntézu heminu, thiaminu, menadionu či tymidinu. Následkem mutací se u nich vyskytuje auxotrofie a to k heminu, thiaminu, menadionu nebo k tymidinu. Kultivace těchto kmenů je podstatně náročnější než u normálních kmenů *S. aureus*. Velmi běžné je, že běžná mikroflóra nebo normální kmeny *S. aureus* často na agaru přerůstají SCV kmeny nebo jejich fenotyp může konvertovat zpět na normální fenotyp [11,26,27].

3 Cíl

V důsledku fyziologických změn trpí pacienti s cystickou fibrózou zvýšenou senzitivitou k infekci dolních cest dýchacích. Tyto infekce mají často chronickou formu a stejný kmen je od těchto pacientů izolován po dobu několika měsíců až let. Na průběh infekce mnou mít významný vliv patogenní vlastnosti infikujícího kmene a jeho rezistence k antibiotikům.

Cílem této bakalářské práce bylo studium chronických izolátů *S. aureus*, které byly odebírány po dobu dvou let od tří pacientů s cystickou fibrózou, s ohledem na výskyt a změnu patogenních vlastností a rezistenci bakteriálních izolátů v průběhu chronické infekce.

4 Materiál

4.1 Kultivační půdy

Pro kultivaci byly použity tyto půdy:

1. Columbia krevní agar s 5% beraní krve – OXOID, Velká Británie
2. Mueller-Hinton (MH) agar - OXOID, Velká Británie
3. Mueller-Hinton agar s přidavkem 5% krve – OXOID, Velká Británie

4.2 Antibiotika

Na DDT - diskový difúzní test, byla použita tato skupina antibiotik. Jejich referenční hodnoty inhibičních zón jsou uvedeny.

Referenční hodnoty inhibičních zón			
ATB	IZ (mm)	ATB	IZ (mm)
Clindamycin (DA)	19	Tetracycline (TE)	19
Erythromycin (E)	18	Lincomycin (MY)	19
Cotrimoxazol (STX)	14	Azithromycin (AZM)	18
Oxacillin (OX)	13	Quinupristin/Dalfopristin (QD)	18
Gentamicin (CN)	18	Linezolid (LZD)	19
Cefoxitin (FOX)	23	Rifampicin (RD)	23

Tabulka č. 1: Antibiotika použitá pro diskový difúzní test, jejich referenční hodnoty inhibičních zón (IZ).

4.3 Latexová aglutinace

Pro latexovou aglutinaci, byl použit speciální PASTOREX STAPH PLUS KIT, od firmy BIO-RAD, Velká Británie.

4.4 Izolace DNA

Na izolaci DNA byl použit extrakční kit AMPLICOR Respiratory Specimen Preparation Kit (Roche).

1.	Respiratory Specimen Wash Sol (RW)
2.	Respiratory Specimen Lysis Reagent (RL)
3.	Respiratory Speciman Neutralization Reagent (RN)

Tabulka č. 2: Popis reagensů obsažených v extrakčním kitu.

4.5 Materiál pro PCR

4.5.1 Komerční sada pro PCR

PPP master mix- TOP BIO, ČR

Voda pro PCR RNase – Free Water, Takara Bio Inc., Japonsko

4.5.2 DNA Standardy

DNA standard použitý při elektroforéze: O'Gene Ruler DNA Ladder Mix, Ready-to-USE 100 – 10 000 bp, Thermo Fisher Scientific.

4.5.3 Primery

Používané primery			
Gen	Primery	Sekvence 5' - 3'	T _m
<i>ermA</i>	<i>ermA1</i>	GTT CAA GAA CAA TCA ATA CAG AG	49,7
	<i>ermA2</i>	GGA TCA GGA AAA GGA CAT TTT AC	51,8
<i>ermB</i>	<i>ermB1</i>	CCG TTT ACG AAA TTG GAA CAG GTA AAG GGC	61,3
	<i>ermB2</i>	GAA TCG AGA CTT GAG TGT GC	53,4
<i>ermC</i>	<i>ermC1</i>	GCT AAT ATT GTT TAA ATC GTC AAT TCC	51,5
	<i>ermC2</i>	GCT AAT ATT GTT TAA ATC GTC AAT TCC	44
<i>msrA</i>	<i>msrA1</i>	GGC ACA ATA AGA GTG TTT AAA GG	52,2
	<i>msrA2</i>	AAG TTA TAT CAT GAA TAG ATT GTC CTG TT	52,8
PVL	PV1	ATC ATT AGG TAA AAT GTC TGG ACA TGA TCC A	56,9
	PV2	GCA TCA ACT GTA TTG GAT AGC AAA AGC	57,8
23S rRNA	P3 (23S V)	CTG TCT CAA CGA GAG ACT CGG	56,7
	P4 (23S V)	CGC TCA CGT TTC AAA GGC TCC	59
<i>Spa</i>	<i>spa-1113f</i>	TAA AGA CGA TCC TTC GGT GAG C	56,6
	<i>spa-1514r</i>	CAG CAG TAG TGC CGT TTG CTT	58,3

Tabulka č. 3: Používané primery pro stanovení genů rezistence, PVL faktoru virulence, mutace v V doméně 23S rRNA, *spa* typizace. Pro každý primer uvedena teplota tání (T_m).

4.6 Elektroforéza

Gel pro elektroforézu obsahoval tyto složky:

1. TBE 50%

2. Agarosa – SERVA, Německo
3. Ethidium bromid – SIGMA, USA

Poz. Pro elektroforézu byl připravován gel o koncentraci 1%.

4.7 Kontrolní kmeny

Pro detekci genů rezistence k MLS_B antibiotikům byly použity kontrolní kmeny *S. aureus*, z nichž byly vytvořeny kontroly pro každý gen rezistence jednotlivě.

Kontrolní kmeny		
<i>S. aureus</i>	HM1055	<i>ermA</i>
<i>S. aureus</i>	CR580	<i>ermB</i>
<i>S. aureus</i>	HM290-1	<i>ermC</i>
<i>S. aureus</i>	RN4220	<i>msrA</i>

Tabulka č. 4: Kontrolní kmeny, které sloužily k vytvoření pozitivních kontrol.

4.8 Použité přístroje

1. Centrifuga – Mini spin plus, Eppendorf AG, Německo
2. Centrifuga/vortex, Multi-Spin MSC – 600, Biosan, Lotyšsko
3. MALDI-TOF/MS analyzátor – Brucker, Daltonics, USA
4. Termocykler – GenePro Thermal cycler, Bioer, USA
5. Laminární box, Scie-plas, Velká Británie
6. Mikrovlnná trouba, Whirlpool M504, Whirlpool Corp., USA
7. Zdroj elektrického napětí pro elektroforézu: Consort E835, Dynex s. r. o., ČR
8. Systém pro dokumentaci pro elektroforézu: Kodak Gel Logic 120, Kodak USA
9. Blokovaný termostat, Grant QBD2, Velká Británie

5 Metodika

5.1 Odběr sputa

Pro mikrobiologické vyšetření se sputum odebírá ráno nalačno. Pacientovi je nejdříve vypláchnuta ústní dutina a pomocí kašle dochází k expektoraci sputa z dolních cest dýchacích. Sputum je poté odebráno do speciální sterilní zkumavky. Vzorek je co nejdříve a to nejpozději do dvou hodin po odebrání transportován do laboratoře k vyšetření. Je velmi důležité, aby nedošlo ke kontaminaci sputa ať již při průchodu v horních cestách dýchacích či v dutině ústní. Mikroskopicky je sputum vyšetřeno a podle přítomnosti či nepřítomnosti leukocytů se vyhodnocuje, zda jde skutečně o sputum. Mikroskopické vyšetření sputa je pomocná metoda a slouží hlavně k ověření kvality sputa [30].

5.2 Kultivace

Hlavní součástí bakteriologického vyšetření představuje kultivace bakterií. Pro úspěšnou kultivaci bakterií *in vitro* je nutné splnit několik základních podmínek např. dostatek živin, vody, růstových faktorů atd. Tyto podmínky splňují kultivační média, která používáme při růstu bakterií *in vitro*. Tato média jsou pak inkubována v optimální teplotě a popřípadě i ve vhodné atmosféře podle druhu bakterie.

Kultivovány byly vzorky od tří pacientů s cystickou fibrózou. Kmeny *S. aureus* byly pomocí sterilní kličky naočkovány na Columbia krevní agar. Columbia krevní agar byl použit také ke kultivaci kmenů *S. aureus* SCV. Naočkované plotny byly přeneseny do termostatu a inkubovány na 24 hodin při 37 °C [31].

5.3 Stanovení citlivosti k antibiotikům

Určení citlivosti bakteriálních patogenů k antibiotickým lékům je jednou z nejvýznamnějších metod v mikrobiologické laboratoři. Pro zahájení léčby antibiotiky je nezbytné, aby byla stanovena citlivost původce infekce k antibiotikům. Bez toho je léčba většinou neúspěšná a může ohrožovat i život pacienta. Metody pro stanovení citlivosti k antibiotikům *in vitro* můžeme rozdělit do dvou skupin a to kvalitativní a kvantitativní. Kvantitativní metody jsou mikrodiluční test a E – testy, které spočívají v určení MIC - minimální inhibiční koncentrace antibiotik. Minimální inhibiční koncentrace je nejnižší možná koncentrace daného antibiotika, která inhibuje růst

bakteriálního patogenu. Kvalitativní metoda tedy diskový difúzní test spočívá v určení citlivosti či rezistence daného bakteriálního kmene k určitému antibiotiku [31].

5.3.1 Diskový difúzní test

DDT (diskový difúzní test) je nejpoužívanější metoda využívaná ke kvalitativnímu stanovení citlivosti k antibiotikům. Princip této metody spočívá v difuzi antibiotika z papírových antibiotických disků do agaru, který je naočkován příslušným kmenem, který chceme vyšetřovat. Bakteriální kmen je převeden pomocí sterilní kličky do zkumavky s fyziologickým roztokem a je vytvořen zákal. Hustota této suspenze musí odpovídat kalibračním zákalovým standardům 0,5 Mc Farlanda. Suspenze je poté přenesena sterilním vatovým tampónem na MH agar v několika směrech na sebe kolmých. Antibiotika v disku jsou kladena na povrch média buď sterilní jehlou nebo pomocí dispensoru. Po přilnutí na povrch, by se s disky již manipulovat nemělo, jelikož antibiotika difundují do agaru okamžitě po jejich přiložení. Klademe maximálně 6 antibiotických disků na MH agar a kultivujeme v termostatu při 37 °C. Difundované antibiotikum inhibuje růst bakteriálního kmene a tím se vytváří kolem disku tzv. inhibiční zóna. Průměr inhibičních zón poté udává, zda je bakteriální kmen k příslušnému antibiotiku citlivý či rezistentní. Po 24 hodinové inkubaci tyto vytvořené inhibiční zóny změříme pomocí posuvného pravítka. Výsledky se porovnávají s referenčními údaji, které výrobce pro jednotlivé antibiotikum udává.

DDT byl proveden podle výše zmíněných podmínek. Na MH agar byly naočkovány kmeny *S. aureus* od pacientů s cystickou fibrózou. Testování citlivosti s kmeny *S. aureus* SCV byl proveden na médiu MH s krví. Pomocí sterilní jehly byly na agar převedeny antibiotické disky a plotny inkubovány v termostatu 24 hodin při 37 °C. Po inkubaci byly změřeny inhibiční zóny vytvořené kolem antibiotických disků. Referenční hodnoty pro antibiotika jsou uvedena v tabulce č 1 [31].

5.4 MALDI – TOF/MS

Principem hmotnostní spektrometrie je rozdělení nabitých částic podle molekulové hmotnosti v elektrickém/magnetickém poli. Hmotnostní spektrometrie MALDI – TOF/MS (Matrix - Assisted Laser Desorption/Ionization Time - of - Flight Mass Spectrometry) je dnes v mikrobiologii využívána pro rychlou identifikaci mikroorganismů. Metoda umožňuje stanovit molekulární hmotnosti látek, kdy na MALDI destičku je aplikována pomocí sterilní kličky kolonie, kterou chceme

vyšetřovat. Na tento rozetřený vzorek aplikujeme matrici. Matrice je ozařována laserem krátkými nanosekundovými pulzy. Energie laseru je absorbována matricí a tím dochází k jejímu rozkladu, vzorek je převeden do plynného stavu a přitom dochází k ionizaci molekul vzorku. Ionty vzorku jsou potom detekovány hmotnostním analyzátozem doby letu. Princip detekce spočívá v měření času, který iont potřebuje, aby překonal vzdálenost mezi místem ionizace a detektorem. Tato doba letu je urychlena stejnosměrným elektrickým proudem a rychlost iontů je pak závislá na jejich hmotnosti a náboji. Získané výsledky o hmotnosti iontů se porovnávají s počítačovou databází, kde je celé spektrum vzorků o přesně definovaném složení, jejichž výsledek byl získán stejným principem. V případě druhové identifikace mikroorganismů se jedná o referenční databázi profilů jednotlivých druhů. Výsledek je pak definován skórem, které určuje nejlepší shodu se známým organismem [31,32].

5.5 Latexová aglutinace

Tato metoda slouží pro rychlou a přesnou detekci bakteriálního kmene v tomto případě *S. aureus*. Na detekční kartu je aplikována kapka suspenze z komerční sady Pastorex Staph Plus Test. Výchozím materiálem pro tento test je kolonie kmene *S. aureus*. Pomocí sterilní kličky je odebrána kolonie a aplikována na destičku a opatrně rozmíchána spolu se suspenzí. Na latexové partikule je navázán imunoglobulin spolu s fibrinogenem. Při reakci s clumping faktorem nebo s proteinem A dochází k viditelné aglutinaci suspenze. Reakce proběhne většinou do několika sekund. Spolu s tímto testem je také aplikována negativní a pozitivní kontrola [31].

5.6 Testování auxotrofie

Působením selekčního tlaku antibiotické léčby se vytvářejí dostatečné podmínky pro uplatnění SCV kmenů. Vznik hemin – auxotrofních SCV nebo menadion - auxotrofních SCV je podmíněn narušením funkce dýchacího řetězce. Narušení funkce dýchacího řetězce vede ke snížení membránového potencionálu SCV kmenů. Díky tomu je porušen transport některých látek a především velmi důležitý transport některých antibiotik do bakteriální buňky, to se může projevit ve výsledku rezistencí k takovým antibiotikům. Mezi tyto antibiotika patří především aminoglykosidy. Hemin – auxotrofní a menadion – auxotrofní SCV byly izolovány u pacientů, kteří trpí chronickými infekcemi, mezi které patří i pacienti s CF.

Pokud dojde k narušení funkce metabolické dráhy pro syntézu pyrimidinových a purinových bází, které jsou nezbytným komponentem při syntéze DNA, dochází ke vzniku thymidin – auxotrofních kmenů SCV. Predisponujícím faktorem pro rezistenci k antibiotiku a především používanému kotrimaxozolu je právě narušení metabolické dráhy. Tyto thymidin – auxotrofní kmeny SCV tvoří převážnou část SCV kmenů. A jejich výskyt je úzce spjat s pacienty s cystickou fibrózou [33].

Auxotrofní testování kmenů *S. aureus* SCV bylo prováděno na MH agaru (OXOID) na který byla aplikována pomocí sterilní kličky suspenze bakteriální kultury kmene *S. aureus* SCV. Na tuto suspenzi byl položen disk, který obsahoval hemin (X-factor, ITEST plus s. r. o.) nebo byl aplikován sterilní disk z filtračního papíru, na který bylo aplikováno 15 µl vzorku thymidinu o koncentraci 100 µg/ml. Po 24 a 48 hodinách byl kontrolován nárůst bakteriálního kmene *S. aureus* SCV kolem aplikovaných disků. Při testování auxotrofie byla provedena i kontrola, která je provedena na MH agaru bez přítomnosti disků s auxotrofním přídatkem. Auxotrofie byla potvrzena na izolátech, které nenarostly na kontrolním MH médiu, jejich růst byl však prokázán kolem disků obsahující thymidin nebo hemin.

5.7 Molekulárně biologické metody

5.7.1 Izolace DNA

K tomu, aby byly provedeny další metody, jako je PCR, elektroforéza atd. bylo nutné provést izolaci DNA. V prvním kroku této metody dochází k lýze bakteriální buňky a to pomocí extrakčního pufru. Tento pufr obsahuje včetně detergentů také EDTA (etylendiaminotetraoctovou kyselinu), chelatační činidlo schopné z roztoků vyvazovat kovové ionty např. Ca^{2+} a Mg^{2+} . Tím jsou neutralizovány nukleázy, které se nacházejí v cytoplazmě a jsou zodpovědné za štěpení nukleových kyselin. Po lýze bakteriální buňky následuje izolace DNA, která se provádí různými způsoby. V laboratoři je nejběžněji prováděna fenol/chloroformová metoda nebo metoda využívající absorpce nukleových kyselin na silikátový povrch. Pro izolaci DNA jsou v současnosti komerčně vyráběny extrakční kity [34].

Pro tuto extrakci DNA byla použita souprava AMPLICOR Respiratory Specimen Preparation Kit (Roche), který obsahoval tyto reagensy:

1. Respiratory Specimen Wash Sol (RW)
2. Respiratory Specimen Lysis Reagent (RL)

3. Respiratory Specimen Neutralization Reagent (RN)

Tato metoda byla prováděna v laminárním boxu a probíhala při optimální laboratorní teplotě. Na izolaci byla použita bakteriální biomasa izolátů *S. aureus* od pacientů s cystickou fibrózou. Pomocí sterilní kličky byla odebrána biomasa a převedena do zkumavky s destilovanou vodou. Z této směsi bylo odebráno 100 µl a převedeno do zkumavky a smícháno s 500 µl roztoku RW. Poté byla směs promíchána na vortexu a vložena do centrifugy na 10 minut při 13000 otáčkách. Po centrifugaci se odstranil supernatant. Zkumavka se po dobu 30 sekund ponechala dnem vzhůru, aby došlo k dostatečnému odstranění kapalné směsi, která by mohla způsobit inhibici PCR reakce. Do zkumavky s peletem bakteriální biomasy bylo přidáno 100 µl RL roztoku a opět se směs promíchala na vortexu. Poté byla zkumavka umístěna v termobloku a temperována na 60 °C po dobu 45 minut. Po krátké centrifugaci zahřáté směsi se do zkumavky přidalo 100 µl RN roztoku. Extrahovaná DNA byla zamražena na -20 °C.

5.7.2 PCR

Polymerázová řetězová reakce (Polymerase Chain Reaction) je jedna z nejvíce používaných molekulárně genetických metod. Principem této metody je amplifikace neboli zmnožení určitého specifického úseku DNA, který chceme vyšetřovat. Reakce probíhá v několika po sobě jdoucích cyklech a každý cyklus je složen ze tří kroků. Prvním krokem je denaturace DNA, kdy zvýšením teploty dochází k separaci vodíkových můstků a z dvouvláknové DNA (dsDNA) vzniká jednovláknová DNA (ssDNA). Druhým krokem je hybridizace nebo annealing, kdy se komplementárně připojují na jednovláknovou DNA primery. Primery jsou krátké úseky DNA o známé sekvenci, obsahují 20-25 nukleotidů. Je velmi důležité, aby primery byly co nejvíce specifické pro oblast, která bude v následujících cyklech amplifikována. Třetím krokem je elongace neboli prodlužování nukleotidových řetězců. Po nasednutí primerů k cílové sekvenci DNA, jsou pomocí Taq-polymerázy připojovány k primerům nové nukleotidy a tím je řetězec prodlužován ve směru 5'-3'. K tomu, aby byla amplifikace úspěšná, je nutné použít termostabilní polymerázu, která je aktivní i přes působení vysokých teplot během reakce. Pro PCR je důležitá také přítomnost vhodného pufru a volných deoxyribonukleotidtrifosfátů (dNTP), které polymeráza připojuje k primerům a prodlužuje tak řetězec. PCR reakci tvoří zpravidla 15-40 cyklů, které na sebe navazují, tím se vytváří dostatečné množství kopií příslušného úseku, který je dále vyšetřován.

Identifikace genů rezistence: *ermA*, *ermB*, *ermC*, *msrA* byla provedena pomocí metody PCR. Používané primery jsou uvedeny v tabulce č. 3 spolu s jejich teplotou tání (T_m). Součástí vyšetření byla negativní a pozitivní kontrola. Negativní kontrola obsahovala pouze PPP master mix (TOP BIO, ČR) a primery. Do pozitivních kontrol byly přidávány kontrolní kmeny *S. aureus* (pro každý gen rezistence jiný a jsou uvedeny v tabulce č. 4). Bylo provedeno celkem 30 cyklů PCR v termocykleru (Bioer, USA). První denaturace probíhala při teplotě 94 °C a trvala 8 minut. V dalších cyklech PCR, byla denaturace po 30 sekundách. Po 30 sekund trval i další krok annealing, kdy teplota byla nastavena pro jednotlivé primery. Přehled teplot pro jednotlivé primery je uveden v tabulce č. 3. Elongace probíhala při 72 °C po dobu 1 minuty a závěrečná elongace po dobu 5 - ti minut. Po ukončení posledního cyklu PCR probíhá chlazení. Vzorky s amplifikovanými úseky byly aplikovány do gelu a byla provedena elektroforéza. Stejný postup byl používán pro vyšetření PVL toxinu [34].

Testování ostatních genů virulence:

Enterotoxinů: *sea*, *sej*, *see*, *sec*, *seh*, *seb*, *seg*, *sed*, *sei*.

Exfoliantinů: *eta*, *etb*, *atd*

Toxinu syndromu toxického šoku: TSST -1

Bylo provedeno Ústavem experimentální biologie, Přírodovědecké fakulty Masarykovy univerzity v Brně.

5.7.3 Elektroforéza

Elektroforéza je metoda, která umožňuje separaci vzorku DNA na agarózovém gelu. V důsledku přítomnosti fosfátových skupin mají částice nukleových kyselin záporný náboj, a proto putují od katody k anodě. Používá se tedy pro oddělení fragmentů DNA a k určení jejich velikosti. Fragment DNA o neznámé velikosti putuje spolu se standardem o známé velikosti agarózovým gelem. Po skončení elektroforézy můžeme určit délku fragmentu vzorku DNA [34].

Pro přípravu agarózového gelu bylo nutné navážit 0,3 g agarózy a rozpustit ji ve 30 ml 50% TBE pufru. Zahřátím v mikrovlnné troubě projde agaróza varem. Do tohoto roztoku bylo přidáno 0,7 μ l interkalárního barviva EtBr. Do plastové vany byly umístěny hřebeny, které po ztuhnutí agarózy vytvoří jamky pro aplikaci vzorků. Agaróza byla aplikována do plastového rámečku s hřebeny, tak aby nedošlo k vytvoření bublin, které by znemožňovaly provést samotný proces elektroforézy. Po ztuhnutí byly hřebeny odstraněny, gel umístěn do elektroforetické vany s 50% TBE pufrem a do

vytvořených jamek pipetovány vzorky. Vždy do první jamky byl aplikován standard. Po skončení elektroforézy, která trvala přibližně 20 minut při 80V byla DNA detekována pod UV zářením a pořízen snímek.

5.8 *Spa* typizace

Tato metoda slouží k typizaci *S. aureus* a je založena na principu sekvenování. Jedná se o analýzu v polymorfní oblasti X pro stafylokokový protein A (*spa*). Tato polymorfní oblast je rozšířena u všech kmenů *S. aureus* a je tvořena různým počtem přibližně 24 bp dlouhých repetitivních sekvencí, uspořádaných v různém pořadí. Výsledkem *spa* sekvenace je vždy *spa* typ kmene *S. aureus*, který určen na základě porovnání se sekvencemi kmenů v databázi pomocí programu Ridom Staph Type.

Amplifikace polymorfní oblasti X pro stafylokokový protein A byla prováděna pomocí PCR. K tomu byly použity primery, které jsou uvedeny v tabulce č. 3. Program PCR byl nastaven na 35 cyklů. Iniciační denaturace trvala 10 minut při 94 °C. Po iniciační denaturaci následovala denaturace, trvající 30 sekund. Druhý krok – annealing při 58 °C po dobu 30 sekund. Třetí krok – elongace při 72 °C a poté následovala závěrečná elongace, trvající 10 minut. Amplifikované úseky byly aplikovány na gel a byla spuštěna elektroforéza, abychom si potvrdili správnost PCR metody. Vzorky byly poté zaslány do Laboratoře molekulární genetiky (LGM) Pediatrické kliniky a Ústavu lékařské mikrobiologie FN Motol ke stanovení sekvence. Výsledky byly porovnány v programu Ridom Staph type [35,36].

5.9 Mutace v 23S rRNA

MLS_B antibiotika, jak již bylo popsáno výše, spojuje stejný mechanismus účinku i stejné cílové místo na které působí. Jsou zaměřeny na specifické nukleotidy 23S rRNA ribozomální podjednotky. U stafylokoků hrají významnou roli při vzniku rezistence k této skupině antibiotik mutace. Mutace, které jsou spojovány s rezistencí k MLS_B antibiotikům je hned několik. Nejvýznamnější jsou mutace v adeninu v pozici A 2058 a A 2059 v doméně V molekuly 23S rRNA. Tyto mutace udělují bakteriím nejvyšší stupeň rezistence na určité makrolidy. Mutaci podléhá i II doména molekuly 23S rRNA nebo geny pro ribozomální proteiny L4, L22. Tyto mutace ovlivňují konformaci oblasti velké ribozomální podjednotky a tím ovlivňují vazbu antibiotik [37,38].

Detekce mutace v 23S rRNA u izolátů *S. aureus* u pacientů s cystickou fibrózou byla určována pomocí sekvenace fragmentu pro V doménu molekuly 23S rRNA jakožto

cílového místa působení MLS_B antibiotik. U všech vzorků byla provedena PCR s použitím specifických primerů pro tuto oblast, které jsou uvedeny v tabulce č. 3. Počet cyklů PCR byl nastaven na 35. Kdy po iniciační denaturaci, která trvala 10 minut při 94 °C, po ní následovala další denaturace, trvající 30 sekund. Dalšími kroky byly annealing (57°C) a elongace (72°C) nukleotidových řetězců, proces končil závěrečnou elongací trvající 10 minut. V posledním kroku byly vzorky schlazeny na 10 °C. Vzorky byly poté aplikovány na gel a byla provedena elektroforéza. Výsledky sloužily k určení, zda byla PCR provedena správně. Následně byly vzorky odeslány k sekvenaci do laboratoře molekulární genetiky (LMG) Pediatrické kliniky a Ústavu lékařské mikrobiologie FN Motol. Získané sekvence byly vyhodnoceny v programu BioEdit (Ibis Biosciences).

6 Výsledky

6.1 Stanovení citlivosti k antibiotikům

6.1.1 DDT-Diskový difúzní test

Výsledky diskového difúzního testu u izolátů *S. aureus* od 3 pacientů s cystickou fibrózou byly odečítány po 24 hodinách po kultivaci v termostatu při 37 °C. Průměry inhibičních zón byly měřeny posuvným pravítkem a vyhodnocovány podle referenčních hodnot inhibičních zón, které jsou uvedeny v tabulce č. 1. Byla provedena analýza celkem 30 izolátů od 3 pacientů, do tohoto testování jsou zahrnuty normální kmeny *S. aureus* a kmeny *S. aureus* SCV. U kmenů *S. aureus* byl použit MH agar. K určení citlivosti k antibiotikům na kmenech *S. aureus* SCV byl použit MH agar s přidavkem 5 % beraní krve. Výsledky testů jsou zobrazeny v tabulkách č. 5, 6, 7 pro každého pacienta jednotlivě.

Vzorky pacienta č. 1 - výsledky												
ATB	AZM	MY	TE	RD	LZD	QD	E	DA	STX	OX	FOX	CN
Vzorek 12/1 – IZ	6	6	24	26	20	21	6	6	26	18	28	20
Výsledek	R	R	C	C	C	C	R	R	C	C	C	C
Vzorek 12/1 SCV – IZ	14	24	16	26	20	20	18	22	6	20	25	18
Výsledek	C	C	C	C	C	C	C	C	R	C	C	C
Vzorek 12/2 – IZ	6	6	21	28	20	22	6	6	27	19	30	21
Výsledek	R	R	C	C	C	C	R	R	C	C	C	C
Vzorek 12/5 – IZ	6	6	25	27	26	24	10	6	27	16	28	18
Výsledek	R	R	C	C	C	C	R	R	C	C	C	C
Vzorek 12/6 – IZ	6	6	23	28	21	23	6	6	27	19	30	20
Výsledek	R	R	C	C	C	C	R	R	C	C	C	C
Vzorek 12/7 – IZ	6	6	25	26	22	21	6	6	25	17	27	21
Výsledek	R	R	C	C	C	C	R	R	C	C	C	C

Tabulka č. 5: Výsledky stanovení citlivosti pomocí DDT u pacienta č. 1. Seznam použitých zkratk antibiotik: AZM-azithromycin, MY-lincomycin, TE-tetracycline, RD-rifampicin, LZD-linezolid, QD-quinupristin/dalfopristin, E-erytromycin, DA-clindamycin, STX-cotrimoxazol, OX-oxacillin, FOX-cefoxitin, CN-Gentamicin. R- rezistentní, C- citlivý, IZ- inhibiční zóna.

Vzorky pacienta č. 1 - výsledky												
ATB	AZM	MY	TE	RD	LZD	QD	E	DA	STX	OX	FOX	CN
Vzorek 34/1 – IZ	20	24	21	26	23	24	23	24	25	17	28	18
Výsledek	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
Vzorek 34/2 – IZ	21	24	22	29	23	27	26	25	27	20	25	21
Výsledek	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
Vzorek 34/2 SCV – IZ	18	21	20	21	17	18	24	20	6	18	23	13
Výsledek	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
Vzorek 34/3 – IZ	20	26	21	27	23	23	26	29	24	15	25	20
Výsledek	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
Vzorek 34/4 – IZ	20	25	22	28	22	23	25	24	27	17	24	18
Výsledek	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
Vzorek 34/5 – IZ	21	24	21	28	24	25	23	24	27	17	24	18
Výsledek	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
Vzorek 34/6 – IZ	21	26	25	30	23	26	24	27	29	16	25	22
Výsledek	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
Vzorek 34/6 SCV – IZ	17	16	14	25	22	21	22	18	27	15	22	15
Výsledek	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
Vzorek 34/7 – IZ	20	24	22	25	24	25	23	24	27	16	27	16
Výsledek	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
Vzorek 34/8 – IZ	20	26	22	26	22	25	25	25	30	18	26	17
Výsledek	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C

Tabulka č. 6: Výsledky stanovení citlivosti u pacienta č. 2. Seznam použitých zkratk antibiotik: AZM-azithromycin, MY-lincomycin, TE-tetracycline, RD-rifampicin, LZD-linezolid, QD-quinupristin/dalfopristin, E-erytromycin, DA-clindamycin, STX-cotrimoxazol, OX-oxacillin, FOX-cefoxitin, CN-Gentamicin. R- rezistentní, C- citlivý, IZ- inhibiční zóna.

Pacient č. 3 -Výsledky citlivosti												
ATB	AZM	MY	TE	RD	LZD	QD	E	DA	STX	OX	FOX	CN
Vzorek 100/1 – IZ	6	6	28	31	25	25	6	6	29	21	32	21
Výsledek	R	R	C	C	C	C	R	R	C	C	C	C
Vzorek 100/2 – IZ	6	6	27	30	23	23	6	6	30	25	30	21
Výsledek	R	R	C	C	C	C	R	R	C	C	C	C
Vzorek 100/2 SCV - IZ	6	6	20	30	20	20	6	6	6	22	27	20
Výsledek	R	R	C	C	C	C	R	R	R	C	C	C
Vzorek 100/3 – IZ	6	6	25	30	24	26	6	6	30	25	30	20
Výsledek	R	R	C	C	C	C	R	R	C	C	C	C
Vzorek 100/3 SCV - IZ	6	6	17	26	20	21	6	6	6	22	25	27
Výsledek	R	R	C	C	C	C	R	R	R	C	C	C
Vzorek 100/4 – IZ	6	6	27	30	24	24	6	6	29	26	30	20
Výsledek	R	R	C	C	C	C	R	R	C	C	C	C
Vzorek 100/5 – IZ	6	6	17	25	18	20	6	6	6	22	26	18
Výsledek	R	R	C	C	C	C	R	R	R	C	C	C
Vzorek 100/6 – IZ	6	6	26	32	26	25	6	6	32	26	30	20
Výsledek	R	R	C	C	C	C	R	R	C	C	C	C
Vzorek 100/6 SCV - IZ	6	6	21	26	22	20	6	6	6	26	25	20
Výsledek	R	R	C	C	C	C	R	R	R	C	C	C
Vzorek 100/7 – IZ	6	6	28	30	23	25	6	6	27	28	32	20
Výsledek	R	R	C	C	C	C	R	R	C	C	C	C
Vzorek 100/7 SCV – IZ	6	6	21	25	23	21	6	6	6	20	23	15
Výsledek	R	R	C	C	C	C	R	R	R	C	C	C
Vzorek 100/8 – IZ	6	6	21	25	23	21	6	6	22	25	27	13
Výsledek	R	R	C	C	C	C	R	R	C	C	C	C

Tabulka č. 7: Výsledky DDT testu u pacienta č. 3 Seznam použitých zkratk antibiotik: AZM-azithromycin, MY-lincomycin, TE-tetracycline, RD-rifampicin, LZD-linezolid, QD-quinupristin/dalfopristin, E-erytromycin, DA-clindamycin, STX-cotrimoxazol, OX-oxacillin, FOX-cefoxitin, CN-Gentamicin. R- rezistentní, C- citlivý, IZ – inhibiční zóna

6.2 MALDI – TOF/MS

Izoláty od 3 pacientů s cystickou fibrózou, které byly vyhodnocovány pomocí hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF/MS měly ve výsledku klasifikace udané skóre. U všech 30 izolátů skóre dosahovalo nad 2.100, výrobcem udávané skóre odpovídalo

nejlepší shodě organismu. Druhová identifikace izolátů od pacientů s cystickou fibrózou vedla ve všech případech k identifikaci izolátů *S. aureus*.

6.3 Latexová aglutinace

Druhová identifikace kmenů *S. aureus* SCV byla provedena kromě MALDI-TOF/MS také pomocí metody latexové aglutinace. Pro tuto reakci byla použita komerční směs Pastorex Staph Plus Test. Na latexové částice je upevněn imunoglobulin spolu s fibrinogenem, při reakci s clumping faktorem nebo se stafylokokovým proteinem A dochází k aglutinaci celé suspenze. U všech vzorků testovaných pomocí latexové aglutinace došlo k viditelné aglutinaci, tedy jsou pozitivní. Latexová aglutinace byla prováděna u SCV *S. aureus* k potvrzení identifikace pomocí MALDI-TOF/MF, z důvodu netypických biochemických a fenotypových vlastností SCV kmenů *S. aureus*.

6.4 Testování auxotrofie

V důsledku mutací dochází u kmenů *S. aureus* SCV k narušení důležitých metabolických drah, důsledkem je auxotrofie těchto kmenů. Kmeny *S. aureus* SCV byly testovány na přítomnost auxotrofie k heminu či thymidinu. Pro test byl použit MH agar (OXOID). Spolu s kolonií *S. aureus* SCV byly na agar přidány i disky s obsahem heminu a thymidinu. Po 24 hodinové inkubaci v termostatu při 37 °C byly odečítány výsledky. Výsledky jsou uvedeny v tabulce č. 8.

Testování auxotrofie	
Vzorky	Výsledky
Vzorek 12/1 SCV	Neprokázáno
Vzorek 34/2 SCV	Neprokázáno
Vzorek 34/6 SCV	Neprokázáno
Vzorek 100/2 SCV	Auxotrofie k thymidinu
Vzorek 100/3 SCV	Auxotrofie k thymidinu
Vzorek 100/6 SCV	Auxotrofie k thymidinu
Vzorek 100/7 SCV	Auxotrofie k thymidinu

Tabulka č. 8: Výsledky testování auxotrofie u kmenů *S. aureus* SCV.

U vzorků byla prokázána auxotrofie k thymidinu, což je také nejčastější auxotrofie kmenů *S. aureus* SCV, která se vyskytuje u pacientů s cystickou fibrózou. U vzorků s neprokázanou auxotrofií došlo k rychlé reverzi k normálnímu fenotypu po subkultivaci, tudíž nebylo možné auxotrofii určit.

6.5 Geny rezistence

6.5.1 *ermA*

Detekce genu rezistence *ermA* byla provedena pomocí PCR, za použití dvou primerů *ermA1* a *ermA2*. Při detekci byly spolu se vzorky použity i kontroly – negativní a pozitivní. Jako negativní kontrola sloužil PPP master mix bez přidané DNA. Jako pozitivní kontrola byl použit kontrolní kmen pro *ermA* gen rezistence *S. aureus* HM1055. Po proběhnutí PCR reakce byly vzorky spolu s kontrolami a se standardem aplikovány do gelu a byla provedena elektroforéza. Po detekci pod UV zářením byly výsledky amplifikace zdokumentovány a jsou uvedeny v tabulce. Geny rezistence byly testovány pouze u izolátů od dvou pacientů, jelikož všechny izoláty od třetího pacienta byly k testovaným antibiotikům citlivé. Výsledky testování genů rezistence byly totožné, proto jsou v tabulce uváděny výsledky všech genů rezistence najednou. Výsledky testování genů *ermA* jsou uvedeny v tabulce č. 9 a 10.

6.5.2 *ermB*

Detekce genu rezistence *ermB* byla provedena pomocí PCR. Na toto vyšetření byly použity primery *ermB1* a *ermB2* jejichž sekvence je uvedena v tabulce č 3. Pozitivní kontrola byla připravena z PPP master mix-TOP BIO, ČR a kontrolní kmen pro gen rezistence *S. aureus* CR580. Po PCR reakci byla provedena elektroforéza a výsledky jsou uvedeny v tabulkách č. 9 a 10.

6.5.3 *ermC*

Stanovení genu rezistence *ermC* byla použita metoda PCR. Pro detekci oblasti genu rezistence byly použity dva primery *ermC1* a *ermC2*. Spolu se všemi vzorky byly připraveny kontroly – pozitivní a negativní. Pozitivní kontrola byla připravena jako v předchozích vyšetřeních z kontrolního kmene *S. aureus* HM290-1. Výsledky elektroforézy jsou uvedeny v tabulkách č. 9 a 10.

6.5.4 *msrA*

Detekce oblasti genu rezistence *msrA* byla provedena s primery *mrsA1*, *mrsA2*. Pro přípravu negativní a pozitivní kontroly byl použit PPP master mix-TOP BIO, ČR. Pozitivní kontrola byla připravena z kontrolního kmene *S. aureus* RN4220. Pro

provedené PCR byla pomocí elektroforézy a následné detekci pod UV zářením detekován gen rezistence *mrsA*. Výsledky jsou uvedeny v tabulkách č. 9 a 10.

Gen rezistence <i>ermA</i> , <i>ermB</i> , <i>ermC</i> , <i>msrA</i>	
Vzorky	Výsledky
Vzorek 12/1	Negativní
Vzorek 12/1 SCV	Negativní
Vzorek 12/2	Negativní
Vzorek 12/5	Negativní
Vzorek 12/6	Negativní
Vzorek 12/7	Negativní
Pozitivní kontrola	Pozitivní
Negativní kontrola	Negativní

Tabulka č. 9: Výsledky testování genů rezistence u pacientů.

Gen rezistence <i>ermA</i> , <i>ermB</i> , <i>ermC</i> , <i>msrA</i>	
Vzorky	Výsledky
Vzorek 100/1	Negativní
Vzorek 100/2	Negativní
Vzorek 100/2 SCV	Negativní
Vzorek 100/3	Negativní
Vzorek 100/3 SCV	Negativní
Vzorek 100/4	Negativní
Vzorek 100/5	Negativní
Vzorek 100/6	Negativní
Vzorek 100/6 SCV	Negativní
Vzorek 100/7	Negativní
Vzorek 100/7 SCV	Negativní
Vzorek 100/8	Negativní
Pozitivní kontrola	Pozitivní
Negativní kontrola	Negativní

Tabulka č. 10: Výsledky testů genů rezistence u všech pacientů

Výsledky všech genů rezistence jsou negativní. Proto byly vybrány kmeny *S. aureus* a testovány na přítomnost mutace v V doméně molekuly 23S rRNA, jako další možná příčina rezistence.

6.6 Faktory virulence

Testování PVL faktoru virulence bylo provedeno pomocí PCR metody. Použité primery pro amplifikaci specifické oblasti byly PVL1 a PVL2. Po proběhnutí PCR

reakce byla provedena elektroforéza a následná detekce výsledků pod UV zářením. Testování dalších faktorů virulence (geny pro enterotoxiny *sea, sej, see, sec, seh, seb, seg, sed, sei*, exfoliatiny *eta, etb, etd* a gen *tst* pro toxin syndromu toxického šoku) bylo prováděno u vybraných kmenů Ústavem experimentální biologie, Přírodovědecké fakulty Masarykovy univerzity v Brně. Výsledky testování PVL faktoru a zasláné vyhodnocené výsledky dalších faktorů virulence Ústavem experimentální biologie jsou uvedeny v tabulce č. 11, 12, 13.

Faktory virulence		
Vzorky	PVL	Enterotoxiny
Vzorek 12/1	Negativní	seg, sei
Vzorek 12/1 SCV	Negativní	seg, sei
Vzorek 12/2	Negativní	N
Vzorek 12/5	Negativní	N
Vzorek 12/6	Negativní	seg, sei
Vzorek 12/7	Negativní	N

Tabulka č. 11: Výsledky testování faktorů virulence u pacienta č. 1. N-netestováno.

Faktory virulence		
Vzorky	PVL	Enterotoxiny
Vzorek 34/1	Negativní	seg, sei
Vzorek 34/2	Negativní	sec, seg
Vzorek 34/2 SCV	Negativní	sec, seg
Vzorek 34/3	Negativní	N
Vzorek 34/4	Negativní	N
Vzorek 34/5	Negativní	N
Vzorek 34/6	Negativní	N
Vzorek 34/6 SCV	Negativní	sec, seg, sei
Vzorek 34/7	Negativní	N
Vzorek 34/8	Negativní	N

Tabulka č. 12: Výsledky faktorů virulence u pacienta č. 2. N-netestováno.

Faktory virulence		
Vzorky	PVL	Enterotoxiny
Vzorek 100/1	Negativní	N
Vzorek 100/2	Negativní	seg, sei
Vzorek 100/2 SCV	Negativní	seg, sei
Vzorek 100/3	Negativní	seg, sei
Vzorek 100/3 SCV	Negativní	seg, sei
Vzorek 100/4	Negativní	N
Vzorek 100/5	Negativní	seg, sei
Vzorek 100/6	Negativní	seg, sei
Vzorek 100/6 SCV	Negativní	seg, sei
Vzorek 100/7	Negativní	seg, sei
Vzorek 100/7 SCV	Negativní	seg, sei
Vzorek 100/8	Negativní	N

Tabulka č. 13: Výsledky testování faktorů virulence. N-netestováno.

6.7 Spa typizace

Prvním krokem ve stanovení *spa* typu izolátů *S. aureus* ze vzorků od pacientů s cystickou fibrózou bylo provedení polymerázové řetězové reakce. K amplifikaci polymorfní oblasti X genu pro stafylokokový protein A byly použity primery *spa-1113f* a *spa-1514r* jejichž sekvence je uvedena v tabulce č. 3. Po dokončení PCR reakce byla provedena elektroforéza, zda byla metoda úspěšná a vzorky byly k sekvenování odeslány do Laboratoře molekulární genetiky (LGM) Pediatrické kliniky a Ústavu lékařské mikrobiologie FN Motol. Pomocí programu Ridom Staph Type byl určen *spa* typ jednotlivých izolátů *S. aureus*. Výsledky pro jednotlivé vzorky od pacientů jsou uvedeny v tabulkách č. 14, 15, 16.

Spa typizace	
Vzorky	Spa typ
Vzorek 12/1	t10416
Vzorek 12/1 SCV	t10416
Vzorek 12/2	t10416
Vzorek 12/5	txAS
Vzorek 12/6	t10416
Vzorek 12/7	t10416

Tabulka č. 14: Výsledky testu *spa* typizace

Výsledky *spa* typizace u prvního pacienta ukazují na to, že byl po celou dobu infikovaný jedním kmenem *S. aureus*. U vzorku 12/5 se může jednat o koinfekci nebo kontaminaci vyšetřovaného vzorku.

Spa typizace	
Vzorky	Spa typ
Vzorek 100/1	t164
Vzorek 100/2	t164
Vzorek 100/2 SCV	t164
Vzorek 100/3	t164
Vzorek 100/3 SCV	t164
Vzorek 100/5	txAU
Vzorek 100/6	t1987
Vzorek 100/6 SCV	t164
Vzorek 100/7	t164
Vzorek 100/7 SCV	t164
Vzorek 100/8	t164

Tabulka č. 15: Výsledky *spa* typizace

Výsledky pacienta č. 2 nasvědčují tomu, že byl infikován jedním bakteriálním kmenem. Vzorky 100/5, 100/6 nasvědčují, že mohlo dojít k infekci jiného bakteriálního kmene nebo vzorky byly kontaminovány při vyšetření nebo odběru.

Spa typizace	
Vzorky	Spa typ
Vzorek 34/1	
Vzorek 34/2	t3682
Vzorek 34/2 SCV	t3682
Vzorek 34/3	t3682
Vzorek 34/4	t3682
Vzorek 34/5	t3682
Vzorek 34/6	t3682
Vzorek 34/6 SCV	t3682
Vzorek 34/7	t3682
Vzorek 34/8	t3682

Tabulka č. 16: Výsledky *spa* typizace

Výsledky vzorků pacienta č. 3 ukazují na přítomnost jediného bakteriálního kmene.

6.8 Mutace v 23S rRNA

Při detekci mutace 23S rRNA byla provedena PCR reakce. Pro detekci specifického úseku byly použity primery P3 (23S V) a P4 (23S V). Jako kontrola byla použita sekvence typového kmene *S. aureus* ATCC 25923. Do dokončení PCR reakce byla provedena elektroforéza a výsledky sloužily k posouzení úspěšnosti metody PCR.

Vzorky byly odeslány do Laboratoře molekulární genetiky (LGM) Pediatrické kliniky a Ústavu lékařské mikrobiologie FN Motol. Výsledky jsou uvedeny v tabulkách.

V důsledku toho, že nebyla objevena u vzorků přítomnost jediného genu rezistence, tak jako možná příčina rezistence byla testována právě mutace cílového místa působení antibiotik. Tato mutace byla potvrzena u jednotlivých testovaných kmenů, kdy došlo k substituci A za G v V doméně genu pro 23S rRNA v cílovém místě působení MLS_B antibiotik. Výsledky testování mutace 23S rRNA jsou uvedeny v tabulkách č. 17, 18 a 19.

Mutace 23S rRNA	
Vzorky	Výsledky
Vzorek 12/1	Přítomna
Vzorek 12/6	Přítomna
Vzorek 12/7	Přítomna

Tabulka č. 17: Výsledky testování mutace 23S rRNA u vybraných vzorků pacienta č. 1.

Výsledky testování vzorků pacienta č. 1 potvrzují, že příčinou rezistence izolátů je mutace v V doméně molekuly 23S rRNA.

Mutace 23S rRNA	
Vzorky	Výsledky
Vzorek 34/1	Není přítomna
Vzorek 34/3	Není přítomna
Vzorek 34/5	Není přítomna
Vzorek 34/6	Není přítomna
Vzorek 34/6 SCV	Není přítomna
Vzorek 34/7	Není přítomna
Vzorek 34/8	Není přítomna

Tabulka č. 18 : Výsledky testu mutace 23S rRNA u vybraných vzorků pacienta č. 2.

U vybraných vzorků pacienta č. 2, které byly testovány na přítomnost mutace v 23S rRNA nebyla potvrzena přítomnost této mutace.

Mutace 23S rRNA	
Vzorky	Výsledky
Vzorek 100/1	Přítomna
Vzorek 100/4	Přítomna
Vzorek 100/6	Přítomna
Vzorek 100/6 SCV	Přítomna
Vzorek 100/7	Přítomna
Vzorek 100/8	Přítomna

Tabulka č. 19 : Výsledky testování mutace 23S rRNA u vybraných vzorků pacienta č. 3.

U izolátů od pacienta č. 3 byla rovněž potvrzena přítomnost mutace v genu pro 23S rRNA.

Diskuze

V teoretické části bakalářské práce byla vypracována literární rešerše, která je zaměřená obecně na cystickou fibrózu, onemocnění které způsobuje. Byly popsány typické bakteriální druhy, které jsou izolovány ze sputa pacientů s cystickou fibrózou. Patří k nim i *S. aureus* – bakterie, na kterou je teoretická a výzkumná část práce zaměřena. *S. aureus* je typický produkci faktorů virulence a vlivem antibiotické léčby i vznikem rezistence na antibiotika, která se používají k eliminaci infekce u pacientů s CF.

Experimentální část bakalářské práce byla prováděna na izolátech od 3 pacientů s cystickou fibrózou s chronickou stafylokokovou infekcí. Zaměřena byla především na určení, zda dochází u izolátů ke změně jejich vlastností a rezistence v průběhu chronické infekce, během níž jsou bakterie vystaveny působení antibiotické léčby, kterou pacienti s cystickou fibrózou podstupují buď jednorázově, ale velmi často profylakticky. Selektivní působení antibiotik, které je u těchto pacientů ještě posíleno jejich výrazně zvýšeným používáním a to v důsledku opakovaných respiračních infekcí, dochází k zvýšení počtu rezistentních kmenů a potlačení kmenů citlivých na používaná antibiotika.

U izolátů bylo provedeno stanovení citlivosti k vybraným antibiotikům pomocí diskového difúzního testu, kdy u některých vzorků u pacientů byla zjištěna rezistence k některým antibiotikům především k erytromycinu, clindamycinu, azithromycinu, lincomycinu. U izolátů byla stanovena citlivost na antibiotika na MH agaru. Pro stanovení citlivosti u kmenů *S. aureus* SCV byly vzorky aplikovány na MH agar s krví, jelikož na rozdíl od normálních kmenů *S. aureus*, jsou poměrně náročné na kultivaci. U pacienta č. 1 a 3 byla potvrzena rezistence k uvedeným antibiotikům, u pacienta č. 2 nebyla nalezena rezistence naopak žádná.

Pro další vyšetření byla provedena u všech vzorků izolace DNA. Pomocí molekulárně biologických metod bylo stanovováno několik dalších parametrů k určení vlastností kmenů *S. aureus*, jako jsou faktory virulence, geny rezistence, *spa* typizace atd. Pro tyto stanovení byla použita polymerázová řetězová reakce. Faktory virulence byly stanovovány s použitím příslušných primerů pro specifickou oblast jednotlivých genů. PVL faktor byl stanovován v laboratoři mikrobiologie, kdy všechny vzorky byly negativní. Testování ostatních enterotoxinů a exfoliatinů byla provedena Ústavem experimentální biologie, Přírodovědecké fakulty Masarykovy univerzity v Brně.

K určení, zda jsou pacienti infikováni jedním bakteriálním kmenem *S. aureus* a nedochází ke kolonizování jinými kmeny *S. aureus*, byla provedena *spa* typizace. Byla provedena PCR s příslušnými primery komplementárními s oblastí, kterou chceme vyšetřovat a vzorky byly odeslány k sekvenaci do Laboratoře molekulární genetiky (LMG), Pediatrické kliniky a Ústavu lékařské mikrobiologie FN Motol. Výsledkem byl *spa* typ kmene *S. aureus*, kdy bylo prokázáno, že jednotliví pacienti jsou infikováni po celou dobu sledování jedním kmenem *S. aureus*.

U izolátů s rezistencí k MLS_B antibiotikům (erytromycin a klindamycin) bylo provedeno testování přítomnosti genů rezistence *ermA*, *ermB*, *ermC* a *msrA* jako možné příčiny vzniku rezistence k těmto antibiotikům. Výsledky však nepotvrdily přítomnost žádného genu rezistence. Proto byla u rezistentních kmenů provedena detekce mutací ve V doméně genu pro 23S rRNA jakožto cílového místa působení MLS_B antibiotik. U vybraných kmenů proto byla použita PCR metoda, k amplifikaci oblasti 23S rRNA. A vzorky byly odeslány k sekvenování do Laboratoře molekulární genetiky (LMG), Pediatrické kliniky a Ústavu lékařské mikrobiologie FN Motol. Výsledky vybraných vzorků ukázaly na přítomnost mutace 23S rRNA. Tedy u izolátů pacienta č. 1 a 3, kdy pomocí DDT testu byla zjištěna rezistence k antibiotiku, je její příčinou mutace 23S rRNA. U izolátů od pacienta č. 2 nebyla zjištěna rezistence k MLS_B antibiotikům a přítomnost mutace nebyla prokázána ani pomocí sekvenování.

Se vznikem rezistence u těchto izolátů by mohlo souviset časté používání makrolidového antibiotika azitromycinu u pacientů s cystickou fibrózou. Azitromycin díky dlouhému poločasu rozpadu vytváří trvalou selekci rezistentních kmenů, která napomáhá jak šíření známých genů rezistence ze skupiny *erm* metyláz a efluxních pump tak vzniku rezistence díky mutacím v cílovém místě působení tohoto antibiotika. Tyto výsledky ukazují znovu na potřebu racionalizace léčby, kdy na jedné straně stojí bezprostřední potřeba léčby pacienta a na druhé nebezpečí šíření rezistence a ztráty účinnosti antibiotika.

ZÁVĚR

Detekce faktorů virulence a genů rezistence byla provedena u izolátů od 3 pacientů s cystickou fibrózou, trpících chronickou stafylokokovou infekcí. Vzorky byly odebírány po dobu dvou let. U izolátů byla stanovena citlivost k antibiotikům a podle výsledku testu DDT se stanovovaly další parametry. Izoláty byly typizovány pomocí metody *spa* typizace. Pomocí molekulárně biologických metod byly stanovovány faktory virulence a u izolátů rezistentních k MLS_B antibiotikům byly detekovány geny rezistence. U žádného z izolátů nebyla přítomnost testovaných genů rezistence potvrzena. Proto jsme přistoupili k testování přítomnosti mutace ve V doméně molekuly 23S rRNA, což je cílové místo působení MLS_B antibiotik. Výsledky potvrdily mutaci v této oblasti u všech rezistentních izolátů. Možnou příčinou rezistence je podávání azitromycinu, který je užíván dlouhodobě pacienty s CF. V teoretické části byla zpracována rešerše na problematiku daného tématu bakalářské práce.

REFERENČNÍ SEZNAM

1. VÁVROVÁ, Věra. Cystická fibróza. 1. vyd. Praha: Grada, 2006, 516 s. ISBN 80-247-0531-1.
2. The history of cystic fibrosis.LETTLEWOOD, Dr James.[online].2009-2012 [cit.2013-11-02].Dostupné z: <http://www.cfmedicine.com/history/earlyyears.htm>
3. Československá pediatrie [online]. Praha:Státní zdravotnické nakladatelství, 2008[cit.2013-11-02].Dostupnéz:http://www.uhkt.cz/files/nrl-dna/cf/pediatrie_2_2008.pdf
4. NUSSBAUM, McInnes a [z anglického originálu přeložil kolektiv pod vedením Petra GOETZE]. *Klinická genetika*. Vyd. 1. Praha: Triton, 2004. ISBN 80-725-4475-6.
5. MAČÁK, Jiří, Jana MAČÁKOVÁ a Jana DVOŘÁČKOVÁ. *Patologie*. 2., dopl. vyd. Praha: Grada, 2012, 347 s., [20] s. barev. obr. příl. ISBN 978-802-4735-306.
6. VÁVROVÁ, Věra, Jana BARTOŠOVÁ a Jana DVOŘÁČKOVÁ. *Cystická fibróza: příručka pro nemocné a jejich rodiče*. 2., dopl. vyd. Praha: Professional Publishing, 2009, 165 s. ISBN 978-80-7431-000-3.
7. Laboratorní příručka- abecední seznam vyšetření. [online]. Vyd. 1. Praha: Grada [cit. 2013-11-04]. Dostupné z: http://www.fnmotol.cz/_sys_/FileStorage/download/1/452/laboratorni-prirucka-abecedni-seznam-vysetreni2.pdf.
8. GREENWOOD, David, Richard C SLACK a John F PEUTHERER. *Lékařská mikrobiologie: přehled infekčních onemocnění: patogeneze, imunita, laboratorní diagnostika a epidemiologie*. 1. vyd. Překlad Jiří Schindler. Praha: Grada, 1999, 686 s. ISBN 80-716-9365-0.
9. BEDNÁŘ, Marek. *Lékařská mikrobiologie: bakteriologie, virologie, parazitologie*. 1. vyd. Praha: Marvil, 1996, 558 s.

10. COUTINHO, Henrique, Vivyanne S FALCÃO-SILVA a Gregório GONÇALVES. Pulmonary bacterial pathogens in cystic fibrosis patients and antibiotic therapy: a tool for the health workers. *International Archives of Medicine* [online]. 2008, vol. 1, issue 1, s. 24- [cit. 2014-03-06]. DOI: 10.1186/1755-7682-1-24. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2586015/>
11. VOTAVA. *Lékařská mikrobiologie speciální*. 1. vyd. Brno: Neptun, 2003, xxii, 495 s. ISBN 80-902-8966-5.
12. COENYE, T., P. VANDAMME, J. R. W. GOVAN a J. J. LIPUMA. *Journal of Clinical Microbiology* [online]. 2001-10-01, vol. 39, issue 10, s. 3427-3436 [cit. 2014-03-10]. DOI: 10.1128/JCM.39.10.3427-3436.2001.
13. FLUME, Patrick A. *CHEST Journal* [online]. 2012-09-01, vol. 142, issue 3, s. 718- [cit. 2014-03-16]. DOI: 10.1378/chest.11-2672. Dostupné z: <http://journal.publications.chestnet.org/article.aspx?doi=10.1378/chest.11-2672>
14. JAKUBEC, MUDr. Petr. Cystická fibróza. *Interní medicína pro praxi* [online]. 2006, č. 5, s. 235-239 [cit. 2014-04-16]. Dostupné z: <http://www.solen.cz/pdfs/int/2006/05/07.pdf>
15. VÁVROVÁ, Věra, Jana BARTOŠOVÁ a Libor FILA. MOŽNOSTI LÉČBY CYSTICKÉ FIBRÓZY – 1. ČÁST. *Klinická farmakologie a farmacie* [online]. 2007, s. 22-26 [cit. 2014-04-16]. Dostupné z: <http://www.klinickafarmakologie.cz/pdfs/far/2007/01/05.pdf>
16. BEDNÁŘ, Marek, Andrej SOUČEK a Jiří VÁVRA. *Lékařská speciální mikrobiologie a parazitologie*. Praha: Triton, 226 s. ISBN 80-901-5214-7.
17. LOWY. Staphylococcus aureus Infections. *New England Journal of Medicine* [online]. 1998-08-20, vol. 339, issue 8, s. 520-532 [cit. 2014-03-25]. DOI: 10.1056/NEJM199808203390806. Dostupné z: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJM199808203390806>

18. TENOVER, F. C., L. M. WEIGEL, P. C. APPELBAUM, L. K. MCDOUGAL, J. CHAITRAM, S. MCALLISTER, N. CLARK, G. KILLGORE, C. M. O'HARA, L. JEVITT, J. B. PATEL a B. BOZDOGAN. Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolate from a Patient in Pennsylvania. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* [online]. 2004-01-01, vol. 48, issue 1, s. 275-280 [cit. 2014-03-27]. DOI: 10.1128/AAC.48.1.275-280.2004.
19. ENRIGHT, M. C., D. A. ROBINSON, G. RANDLE, E. J. FEIL, H. GRUNDMANN, B. G. SPRATT, N. CLARK, G. KILLGORE, C. M. O'HARA, L. JEVITT, J. B. PATEL a B. BOZDOGAN. The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2002-05-28, vol. 99, issue 11, s. 275-280 [cit. 2014-03-27]. DOI: 10.1073/pnas.122108599. Dostupné z: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.122108599>
20. ZAHRADNICKÝ, Jiří. *Mikrobiologie a epidemiologie: Učební text pro střední zdravotnické školy*. Praha: Avicenum, 1987.
21. HAUSER, A. R., M. JAIN, M. BAR-MEIR a S. A. MCCOLLEY. Clinical Significance of Microbial Infection and Adaptation in Cystic Fibrosis. *Clinical Microbiology Reviews*. 2011-01-13, vol. 24, issue 1, s. 29-70. DOI: 10.1128/CMR.00036-10.
22. O'RIORDAN, K. *Clinical Microbiology Reviews* [online]. 2004-01-15, vol. 17, issue 1 [cit. 2014-04-01]. DOI: 10.1128/CMR.17.1.218-234.2004.
23. VOTAVA, Miroslav. *Lékařská mikrobiologie obecná*. Brno: Neptun, 2005, 351 s. ISBN 80-868-5000-5.
24. BIEN, Justyna, Olga SOKOLOVA a Przemyslaw BOZKO. Characterization of Virulence Factors of *Staphylococcus aureus*: Novel Function of Known Virulence Factors That Are Implicated in Activation of Airway Epithelial Proinflammatory Response. *Journal of Pathogens*. 2011, vol. 2011, s. 1-13. DOI: 10.4061/2011/601905.

25. DINGES, M. M., P. M. ORWIN a P. M. SCHLIEVERT. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clinical Microbiology Reviews* [online]. 2000-01-01, vol. 13, issue 1, s. 16-34 [cit. 2014-04-02]. DOI: 10.1128/CMR.13.1.16-34.2000. Dostupné z: <http://cmr.asm.org/cgi/doi/10.1128/CMR.13.1.16-34.2000>
26. KAHL, B. C., A. DUEBBERS, G. LUBRITZ, J. HAEBERLE, H. G. KOCH, B. RITZERFELD, M. REILLY, E. HARMS, R. A. PROCTOR, M. HERRMANN a G. PETERS. Population Dynamics of Persistent *Staphylococcus aureus* Isolated from the Airways of Cystic Fibrosis Patients during a 6-Year Prospective Study. *Journal of Clinical Microbiology*. 2003-09-01, vol. 41, issue 9, s. 4424-4427. DOI: 10.1128/JCM.41.9.4424-4427.2003.
27. KAHL, B., M. HERRMANN, A. S. EVERDING, H. G. KOCH, K. BECKER, E. HARMS, R. A. PROCTOR a G. PETERS. Persistent Infection with Small Colony Variant Strains of *Staphylococcus aureus* in Patients with Cystic Fibrosis. *Journal of Infectious Diseases*. 1998-04-01, vol. 177, issue 4, s. 1023-1029. DOI: 10.1086/515238.
28. LECLERCQ, R. Mechanisms of Resistance to Macrolides and Lincosamides: Nature of the Resistance Elements and Their Clinical Implications. *Clinical Infectious Diseases*. 2002-02-15, vol. 34, issue 4, s. 482-492. DOI: 10.1086/324626. Dostupné z: <http://cid.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1086/324626>
29. ROBERTS, Marilyn C., Joyce SUTCLIFFE, Patrice COURVALIN, Lars Bogo JENSEN, Julian ROOD a Helena SEPPALA. *Nomenclature for Macrolide and Macrolide-Lincosamide-Streptogramin B Resistance Determinants* [online]. 1999, č. 12 [cit. 2014-03-13]. Dostupné z: <http://aac.asm.org/content/43/12/2823.full>
30. KELNAROVÁ, Jarmila. *Ošetrovatelství pro střední zdravotnické školy - 2. ročník*. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, 228 s. ISBN 978-802-4731-063
31. VOTAVA, Miroslav. *Lékařská mikrobiologie: vyšetřovací metody*. Brno: Neptun, 2010, 495 s. ISBN 978-808-6850-047
32. KÁŠ, Milan KODÍČEK a Olga VALENTOVÁ. *Laboratorní techniky biochemie*. 1. vyd. Praha: VŠCHT, 2005, 258 s. ISBN 80-708-0586-2
33. TKADLEC J., MELTER O. (2013), Trpasličí kmeny-Small colony variants *Staphylococcus aureus*-review. *Klinická mikrobiologie a infekční lékařství* 2013,19(3): 96-102

34. KOČÁREK, Eduard. *Molekulární biologie v medicíně*. 1. vyd. Brno: Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotnických oborů, 2007. ISBN 978-807-0134-504.
35. KOREEN, L., S. V. RAMASWAMY, E. A. GRAVISS, S. NAIDICH, MUSSER a B. N. KREISWIRTH. Spa Typing Method for Discriminating among *Staphylococcus aureus* Isolates: Implications for Use of a Single Marker To Detect Genetic Micro- and Macrovariation. *Journal of Clinical Microbiology* [online]. 2004-02-06, vol. 42, issue 2 [cit. 2014-04-21]. DOI: 10.1128/JCM.42.2.792-799.2004. Dostupné z: <http://jcm.asm.org/cgi/doi/10.1128/JCM.42.2.792-799.2004>
36. Shopsin B., Gomez M., Montgomery S. O., Smith D. H., Waddington M., Dodge D.E., Bost D.A, Riehman M., 1999. Evaluation of protein A gene polymorphic region DNA sequencing for typing of *Staphylococcus aureus* strains. *Journal of Clinical Microbiology*. 37: 3556-3563.
37. PRUNIER, A.-L., B. MALBRUNY, D. TANDE, B. PICARD a R. LECLERCQ. Clinical Isolates of *Staphylococcus aureus* with Ribosomal Mutations Conferring Resistance to Macrolides. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* [online]. 2002-09-01, vol. 46, issue 9, s. 3054-3056 [cit. 2014-04-21]. DOI: 10.1128/AAC.46.9.3054-3056.2002. Dostupné z: <http://aac.asm.org/cgi/doi/10.1128/AAC.46.9.3054-3056.2002>
38. VESTER, B. a S. DOUTHWAITE. Macrolide Resistance Conferred by Base Substitutions in 23S rRNA. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* [online]. 2001-01-01, vol. 45, issue 1, s. 1-12 [cit. 2014-04-21]. DOI: 10.1128/AAC.45.1.1-12.2001. Dostupné z: <http://aac.asm.org/cgi/doi/10.1128/AAC.45.1.1-12.2001>